

PCT/JP 99/02650

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.05.99

09 / 700643

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

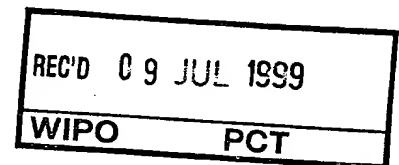
1998年 5月21日

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第140293号

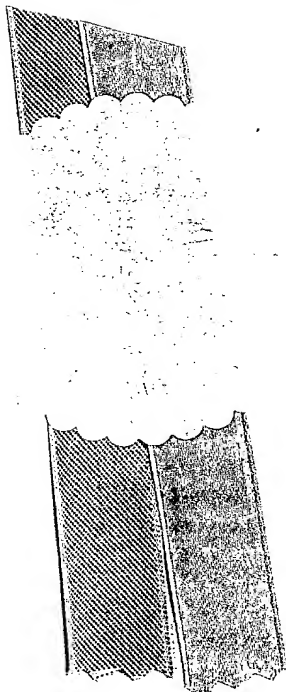
出 願 人
Applicant(s):

武田薬品工業株式会社



**PRIORITY
DOCUMENT**

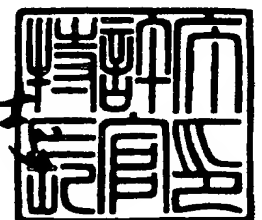
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年 6月17日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3041122

【書類名】 特許願

【整理番号】 A98081

【提出日】 平成10年 5月21日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 15/28

【発明の名称】 抗体およびその用途

【請求項の数】 7

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1丁目7番地9 武田春日ハイツ 1
204号

【氏名】 松本 寛和

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市南向陽町 1丁2番8号

【氏名】 北田 千恵子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日 1丁目7番地9 武田春日ハイツ 1
402号

【氏名】 日沼 州司

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代表者】 武田 國男

【代理人】

【識別番号】 100073955

【弁理士】

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】抗体およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項2】P2L-1CaまたはP2L-2Caで標示される請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】19P2リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項4】P2L-1Taで標示される請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】請求項1または請求項3記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法。

【請求項6】請求項1記載の抗体と請求項3記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドの定量法。

【請求項7】請求項1または請求項3記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、19P2リガンドまたはその誘導体に結合特異性を有する新規なモノクローナル抗体に関する。更に詳しくは、抗原抗体反応に基づく19P2リガンドまたはその誘導体の定量法の開発、および、中和活性を利用して19P2リガンドまたはその誘導体に関与する疾患の診断あるいは予防・治療剤の開発に有用な抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

19P2リガンドは、オーファンG蛋白質共役型レセプター(19P2)に対するリガンドとして見出された新規ペプチドであり、脳(特に視床下部)に最も多く存在し、またそのレセプターである19P2が下垂体に最も多く局在すること

から、新規の視床下部ホルモン（向下垂体性ホルモン）の一つであると考えられている。また、19P2リガンドは、その配列から（1）31残基よりなる19P2-L31（31個のアミノ酸からなるペプチド）と、（2）12番目のThrより始まる19P2-L20（20個のアミノ酸からなるペプチド）の存在が推測されている（WO97/24436）。

〔以下、31個のアミノ酸からなる19P2リガンドを、19P2リガンド（1-31）、または、19P2-L31と呼び、20個のアミノ酸からなる19P2リガンドを、19P2リガンド（12-31）、または、19P2-L20と呼ぶ場合もある。〕

【0003】

ウシ、ヒトおよびラットの19P2リガンド（1-31）のアミノ酸配列を以下に示す。

〔ウシ19P2リガンド（1-31）〕（配列番号：1）

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-
Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

〔ヒト19P2リガンド（1-31）〕（配列番号：2）

H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-
Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

〔ラット19P2リガンド（1-31）〕（配列番号：3）

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-
Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

ウシ、ヒトおよびラットの19P2リガンド（12-31）のアミノ酸配列を以下に示す。

〔ウシ 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 13)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

〔ヒト 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 5)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

〔ラット 19P2 リガンド (12-31)〕 (配列番号: 14)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-
Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-
Phe-NH₂

【0004】

下垂体ホルモンの調節因子である視床下部ホルモンの異常は様々な病態と関連している。視床下部ホルモンの一つと考えられる 19P2 リガンドは、下垂体ホルモンが関与する何らかの作用を有すると考えられるが、その生理機能についてはまだ未解明な部分が多い。従って、19P2 リガンドの生理作用を解明するために、19P2 リガンドを簡便かつ高感度に検出・定量する測定系が切望されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、19P2 リガンドまたはその誘導体を感度よく特異的に定量することができるモノクローナル抗体、および該抗体を用いる 19P2 リガンドまたはその誘導体の検出・定量法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、19P2 リガンドまたはその誘導体の異なる部分を特異的に認識する複数のモノクローナル抗体を作製し、これら抗体を用いることにより 19P2 リガンドまたはその誘導

体の高感度の優れた検出・定量法を開発した。さらに研究を行った結果、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、19P2リガンドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、該抗体およびハイブリドーマ細胞の製造法、該抗体を用いた競合法あるいはサンドイッチ法による19P2リガンドおよびその誘導体の免疫測定法に関する。

さらに詳しくは、本発明者らは[Cys¹⁷] 19P2リガンド(17-31)および[Cys²⁵] 19P2リガンド(12-25)を免疫原として、モノクローナル抗体を複数作製し、これらを組み合わせることにより、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度にかつ特異的に検出し得る免疫測定法を開発した。即ち、ウチログロブリン(BTG)と[Cys¹⁷] 19P2リガンド(17-31)および[Cys²⁵] 19P2リガンド(12-25)との複合体を免疫原として19P2リガンド(1-31)またはその誘導体のC端部および中間部を認識するモノクローナル抗体、例えばP2L-1CaおよびP2L-1Taを確立した。これらの抗体はいずれも、パーオキシダーゼ(HRP)標識化した[Cys¹⁷] 19P2リガンド(17-31)および[Cys²⁵] 19P2リガンド(12-25)を用いる競合法免疫測定法では、19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)に対して極めて高い親和性を示し、この2種類のモノクローナル抗体を組み合わせることにより、19P2-L31および19P2-L20に対して極めて高感度なサンドイッチ-免疫測定法を与えることが明かとなった。本発明により、19P2リガンドを簡便にかつ高感度に測定することが可能となり、生体成分中の19P2リガンドの変動をモニターすることによりその生理機能の解明に大いに役立つものと思われる。

【0007】

即ち、本発明は、

(1) 19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反

応するモノクローナル抗体、

(2) P2L-1CaまたはP2L-2Caで標示される上記(1)記載のモノクローナル抗体、

(3) 19P2リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体、

(4) P2L-1Taで標示される上記(3)記載のモノクローナル抗体、

(5) 上記1または上記3記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法、

(6) 上記1記載の抗体と上記(3)記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドの定量法、および、

(7) 上記1または上記(3)記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞に関する。

【0008】

さらに、本発明は、

(1) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とするP2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体。

(2) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応するP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体。

(3) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする19P2リガンドまたはその誘導体の中間部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体。

(4) 上記(1)、上記(2)または上記(3)記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法。

(5) 上記(3)記載の抗体と、上記(1)または上記(2)記載の抗体を用いることを特徴とする被検液中の19P2リガンドの定量法。

(6) 高プロラクチン血症の診断に用いられる上記(4)ないし(5)記載の定量法。

上記(1)の好ましい態様は、

(7) 19P2リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号5または配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記

(1)記載の抗体、

(8) 19P2リガンドの誘導体が①配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列の第18番目～31番目のアミノ酸配列を有するペプチドであってC端がアミドであるペプチド、③配列番号：5または配列番号：13で表されるアミノ酸配列の第8番目～20番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号：1～配列番号：7または配列番号11、12で表されるアミノ酸配列のC末端の9残基のアミノ酸配列を有するペプチドである第(1)記載の抗体、

(9) 19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドが、19P2リガンドのN端のアミノ酸から数えて20番目以降のアミノ酸配列を有する部分ペプチドである上記(1)記載の抗体、

(10) 抗体が配列番号：10で表されるC末端がカルボン酸となったアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識しないことを特徴とする上記(1)、(7)、

(8)ないしは(9)記載の抗体、

(11) 抗体が配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を認識しないことを特徴とする上記(1)、(7)、(8)ないし(9)記載の抗体、

(12) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識するが、配列番号：11で表されるC末端のPheが欠けたアミノ酸配列を有するペプチドを認識しないことを特徴とする上記(1)、(7)、(8)、(9)、(10)ないしは(11)記載の抗体

(13) P2L-1Caで標示される上記(1)、(7)、(8)、(9)、(10)ないしは(11)記載のモノクローナル抗体、

(14) 配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5および配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するペプチドに対して中和活性を有する上記(1)、(7)、(8)、(9)、(10)ないしは(11)記載のモノク

ローナル抗体

(15) 19P2リガンドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる上記(1)、(7)、(8)、(9)、(10)ないしは(11)記載の抗体である

上記(2)の好ましい態様としては、

(16) 19P2リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(2)記載の抗体、

(17) 19P2リガンドの誘導体が①配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：1、配列番号：2または配列番号：3で表されるアミノ酸配列の第18番目～31番目のアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：5で表されるアミノ酸配列の第8番目～20番目のアミノ酸配列を有するペプチドまたは④配列番号：1～配列番号：配列番号：7または配列番号11、12で表されるアミノ酸配列のC末端の13残基のアミノ酸配列を有するペプチドである上記(2)記載の抗体、

(18) 抗体が配列番号：10で表されるC末端がカルボン酸となったアミノ酸配列を有する部分ペプチドおよび配列番号9で表されるアミノ酸配列を認識することを特徴とする上記(2)、(16)ないしは(17)記載の抗体、

(19) 抗体が配列番号1、2、3で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとそれぞれ反応性が異なる上記(2)、(16)ないしは(17)記載の抗体、

(20) 19P2リガンドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる上記(2)、(16)、(18)または(19)記載の抗体である。

上記(3)の好ましい態様は、

(21) 19P2リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(3)記載の抗体、

(22) 19P2リガンドの誘導体が①配列番号：1で表されるアミノ酸配列の第12番目～24番目のアミノ酸配列を有するペプチド、②配列番号：2で表さ

れるアミノ酸配列の第12番目～24番目のアミノ酸配列を有するペプチド、③配列番号：3で表されるアミノ酸配列の第12番目～24番目のアミノ酸配列を有するペプチド、④配列番号：5で表わされるアミノ酸配列から第1番目～12番目のアミノ酸配列を有するペプチド または ⑤配列番号：13で表されるアミノ酸配列から第1番目～12番目のアミノ酸配列を有するペプチドである上記（3）記載の抗体、

（23）抗体が配列番号：4ないしは配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを認識しない上記（3）、（21）ないし（22）記載の抗体、

（24）抗体がモノクローナル抗体である上記（3）、（21）、（22）ないし（23）記載の抗体、

（25）P2L-1Taで標示される上記（24）記載のモノクローナル抗体

（26）P2L-3Taで標示される上記（24）記載のモノクローナル抗体および

（27）19P2リガンドまたはその誘導体のサンドイッチ法酵素免疫測定法による定量に用いられる上記（3）、（21）、（22）、（23）ないし（25）記載の抗体である。

また、ハイブリドーマ細胞として、

（28）上記（1）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

（29）上記（2）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞、

（30）上記（14）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞

、
（31）上記（25）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞

、
（32）上記（26）記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞

、
上記（4）の好ましい態様としては、

（33）上記（1）、上記（2）または上記（3）記載の抗体と、被検液および標識化19P2リガンドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化19P2リガンドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とす

る被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法である。

上記(5)の好ましい態様としては、

(34) 担体上に不溶化した19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体、標識化された19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とし、担体上に不溶化した19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された19P2リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が上記(1)記載の抗体であり、他方が配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体であることを特徴とする被検液中の19P2リガンドまたはその誘導体の定量法、

(35) 配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識する抗体がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体である上記(34)記載の定量法、

(36) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1CaまたはP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体である上記(34)記載の定量法、

(37) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-2Ca、P2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記(34)記載の定量法、

(38) 担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1Ca、P2L-1TaまたはP2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび（または）配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（34）記載の定量法、

（39）担体上に不溶化した19P2リガンドに対する抗体および標識化された19P2リガンドに対する抗体の一方がP2L-1Taで標示されるモノクローナル抗体であり、他方がP2L-1CaまたはP2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体であり、19P2リガンドまたはその誘導体が配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するペプチドおよび（または）配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである上記（34）記載の定量法に関する。

【0009】

本発明における19P2リガンドとしては、アミノ酸31残基からなる19P2リガンド（1-31）とアミノ酸20残基からなる19P2リガンド（12-31）がある。例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（1-31）、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド（1-31）、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（1-31）、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド（12-31）または配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド（12-31）などが用いられる。

本発明における19P2リガンドの誘導体としては、例えば、上記19P2リガンドのN端部のアミノ酸がそれぞれ16ないし17残基程度欠落したもの、C端部のアミノ酸が1残基欠落したもの、L-グリシンをD-アラニンに置換したもの、C末端アミドをカルボン酸に変換したもの、C端側にL-グリシンとL-アルギニンを付加したもの、L-システインを付加したもの、N端部にアセチル

基を有するものなどが用いられる。具体的には、①配列番号：4で表されるアミノ酸配列から第1番目～16番目のアミノ酸配列が欠如したペプチド、②配列番号：6で表される配列番号：4で表されるペプチドのアセチル基が付加したペプチド、③配列番号：8で表される第29番目のグリシンがL-アラニンに変換したペプチド、④配列番号：9で表されるC端側にL-グリシンとL-アルギニンを付加したものペプチド、⑤配列番号：10で表されるアミノ酸配列のC末端アミドをカルボン酸に変換しペプチド、⑥配列番号：11で表されるアミノ酸配列の第31番目のPheの欠如したペプチドなどが用いられる。

これらの19P2リガンドまたはその誘導体は、(a)例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物から自体公知の方法で調製することもできるし、(b)ペプチド・シンセサイザー等を使用する自体公知のペプチド合成方法で化学的に合成することもできる。

【0010】

本発明における19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドとしては、配列番号：7で表されるアミノ酸配列の第18番目～31番目のアミノ酸配列を有するペプチドであって、そのN端にシステインが付加したペプチドが挙げられる。

本発明における19P2リガンドまたはその誘導体のC端側の部分ペプチドに特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）としては、例えば19P2リガンドまたはその誘導体を認識する抗体などが用いられる。

より具体的には、これらの抗体の中でも、

(i) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（18-31））を認識するが、抗体配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（12-24））を認識しない抗体、

(ii) 配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（18-31））を認識し、配列番号：12で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2リガンド（12-24））を認識する抗体が挙げられる。

上記(i)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-31)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド(1-31)、配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(12-31)および(または)配列番号：13で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(12-31)を特異的に認識する抗体がより好ましく、さらには配列番号：8で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド[D-Ala²⁹](1-31)を認識するが、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-30)、配列番号：10で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-OH、配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-Gly-Ala-OHを認識しない抗体が好ましい。

【0011】

また、上記(ii)の抗体の中でも、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-31)、配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するラット19P2リガンド(1-31)および(または)配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(12-31)を特異的に認識する抗体が好ましく、さらには配列番号：11で表されるアミノ酸配列を有するヒト19P2リガンド(1-30)および配列番号：9で表されるアミノ酸配列を有するウシ19P2リガンド(1-31)-Gly-Ala-OHを認識する抗体が好ましい。

上記(i)の抗体の代表例としては、P2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体があり、上記(ii)の抗体の代表例としては、P2L-2Caで標示されるモノクローナル抗体が挙げられる。

【0012】

次に、本発明における19P2リガンドまたはその誘導体の中心部の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、例えば配列番号：7で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識せず、配列番号：12で表され

るアミノ酸配列を有する部分ペプチドを認識することを特徴とする 19P2 リガンドまたはその誘導体に特異的に反応する抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）などが用いられる。これら抗体のなかでも、配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を有するウシ 19P2 リガンド（1-31）、配列番号：2 で表されるアミノ酸配列を有するヒト 19P2 リガンド（1-31）、配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を有するラット 19P2 リガンド（1-31）、配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を有するヒト 19P2 リガンド（12-31）、配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を有するウシ 19P2 リガンド（12-31）、および（または）配列番号：14 で表されるアミノ酸配列を有するラット 19P2 リガンド（12-31）を特に認識する抗体が好ましく、配列番号：4 または配列番号：6 で表されるアミノ酸配列から第 1 番目～16 番目のアミノ酸配列が欠如したアミノ酸配列を有するペプチドを認識しない抗体が好ましい。具体的には、P2L-1Ta、P2L-2Ta、P2L-3Ta または P2L-4Ta で標示されるモノクローナル抗体などが用いられる。これらモノクローナル抗体のなかでも、特に P2L-1Ta が好適である。

【0013】

以下に、本発明におけるモノクローナル抗体の抗原の調製方法、および該モノクローナル抗体の製造方法について詳細に説明する。

（1）抗原の調製

本発明の抗体を調製するために使用される抗原としては、例えば 19P2 リガンドまたはその誘導体、19P2 リガンドと同一の抗原決定基を 1 種あるいは 2 種以上有する合成ペプチドなど何れのものも使用することができる（以下、これらを単に 19P2 リガンド抗原と称することもある）。

該 19P2 リガンドまたはその誘導体としては、前述したものが用いられる。これら 19P2 リガンドまたはその誘導体は、（a）例えばヒト、サル、ラット、マウスなどの哺乳動物の組織または細胞から自体公知の方法あるいはそれに準ずる方法を用いて調製することもできるし、（b）ペプチド・シンセサイザー等を使用する自体公知のペプチド合成方法で化学的に合成することもできる。また、（c）該 19P2 リガンドまたはその誘導体は、それをコードする DNA を含

有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

(a) 該哺乳動物の組織または細胞から調製する場合、その組織または細胞をホモジナイズした後、酸、またはアルコールなどで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

(b) 化学的に合成する場合、該合成ペプチドとしては、例えば上述した天然より精製した 19P2 リガンド抗原と同一の構造を有するものや、19P2 リガンド (1-31) などのアミノ酸配列において 3 個以上、好ましくは 6 個以上のアミノ酸からなる任意の箇所のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を 1 種あるいは 2 種以上含有するペプチド (以下 19P2 リガンド関連合成ペプチドと略す) などが用いられる。

(c) DNA を含有する形質転換体を用いて該 19P2 リガンドまたはその誘導体を製造する場合、そのリガンドまたはその誘導体をコードする DNA は、公知のクローニング方法 [例えば、Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法など] に従って作成することができる。該クローニング方法とは、(1) 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインした DNA プローブまたは DNA プライマーを用い、cDNA ライブラリーからハイブリダイゼーション法により該ペプチドをコードする DNA を含有する形質転換体を得る方法、または (2) 該ペプチドのアミノ酸配列に基づきデザインした DNA プライマーを用い、PCR 法により該ペプチドをコードする DNA を含有する形質転換体を得る方法が挙げられる。

【0014】

上記したように該抗原としてのペプチドは、(1) 自体公知のペプチドの合成法に従って、または (2) 本発明のペプチドを含有するペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

該ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、該ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することに

より目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～②に記載された方法等が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて該ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0015】

ペプチドのアミド体は、アミド形成に適した市販のペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のペプチドを取得する。あるいはクロロトリチル樹脂、オキシム樹脂、4-ヒドロキシ安息香酸系樹脂等を用い、部分的に保護したペプチドを取り出し、更に常套手段で保護基を除去し目的のペプチドを得ることもできる。

上記した保護されたアミノ酸の縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3

-ジメチルアミノプロリル) カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤 (例えば、HOBt、HOOBtなど) とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～約50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常約1.5ないし約4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0016】

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、

ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、 Cl_2 -Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル [アルコール (たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

【0017】

保護基の除去 (脱離) 方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に -20°C ～ 40°C の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また

、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

【0018】

19P2リガンド抗原は、凝集しやすいため、不溶化したものを直接免疫することもできる。また、該19P2リガンド抗原を適当な担体に結合または吸着させた複合体を免疫してもよい。該担体および担体（キャリアー）と19P2リガンド抗原（ハプテン）との混合比は、担体に結合あるいは吸着させた19P2リガンド抗原に対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で結合あるいは吸着させてもよく、通常ハプテン抗原に対する抗体の作製にあたり常用されている天然もしくは合成の高分子担体を重量比でハプテン1に対し0.1～100の割合で結合あるいは吸着させたものを使用することができる。天

然の高分子担体としては、例えばウシ、ウサギ、ヒトなどの哺乳動物の血清アルブミンや例えばウシ、ウサギなどの哺乳動物のチログロブリン、例えばウシ、ウサギ、ヒト、ヒツジなどの哺乳動物のヘモグロビン、キーホールリンペットヘモシアニンなどが用いられる。合成の高分子担体としては、例えばポリアミノ酸類、ポリスチレン類、ポリアクリル類、ポリビニル類、ポリプロピレン類などの重合物または供重合物などの各種ラテックスなどを用いることができる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができる。例えば、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンを架橋するビスジアゾ化ベンジジンなどのジアソニウム化合物、アミノ基同志を架橋するグルタルアルデヒドなどのジアルデヒド化合物、トルエン-2, 4-ジイソシアネートなどのジイソシアネート化合物、チオール基同志を架橋するN,N'-o-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド化合物、アミノ基とチオール基を架橋するマレイミド活性エステル化合物、アミノ基とカルボキシル基とを架橋するカルボジイミド化合物などが好都合に用いられる。また、アミノ基同志を架橋する際にも、一方のアミノ基にジチオピリジル基を有する活性エステル試薬（例えば、SPDPなど）を反応させた後還元することによりチオール基を導入し、他方のアミノ基にマレイミド活性エステル試薬によりマレイミド基を導入後、両者を反応させることもできる。

【0019】

(2) モノクローナル抗体の作製

19P2リガンド抗原は、温血動物に対して、例えば腹腔内注入、静脈注入、皮下注射などの投与方法によって、抗体産生が可能な部位にそれ自体単独であるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどがあげられるが、モノクローナル抗体作製にはマウス、ラットなどが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体の作製に際しては、19P2リガンド抗原を免疫された温

血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、抗19P2リガンドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。血清中の抗19P2リガンド抗体価の測定は、例えば後記の標識化19P2リガンドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGなどが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、APP-1などがあげられるが、P3U1などが好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓細胞数との好ましい比率は、通常1:1～20:1程度であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) が10～80%程度の濃度で添加され、通常20～40℃、好ましくは30～37℃で通常1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

【0020】

抗19P2リガンド抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば19P2リガンドあるいは19P2リガンド関連合成ペプチドを直接あるいは担体とともに吸着させた固相 (例、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗19P2リガンドモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した19P2リガンドを加え、固相に結合した抗19P2リガンドモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗19P2リガンドモノクローナル抗体のスクリーニング、育種は通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞

用培地（例、RPMI 1640）で行われる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗 19P2 リガンド抗体価の測定と同様にして測定できる。

抗 19P2 リガンドモノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法など〕に従って行われる。

【0021】

また、19P2 リガンドの一部領域と反応する抗 19P2 リガンド抗体を産生するハイブリドーマおよび、19P2 リガンドとは反応するがその一部領域とは反応しない抗 19P2 リガンドモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングはたとえばその一部領域に相当するペプチドとハイブリドーマが産生する抗体との結合性を測定することにより行うことができる。

以上のようにして得られる①P2L-1Caで標示されるモノクローナル抗体、②P2L-3Caで標示されるモノクローナル抗体および③19P2 リガンドまたはその誘導体の中心部分の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体P2L-3Taで標示されるモノクローナル抗体は、それぞれ19P2 リガンドのC端側および中心部分の部分ペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の19P2 リガンドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

【0022】

即ち、本発明は、

（1）本発明の19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体と、被検液および標識化19P2 リガンドまたはその誘導体とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化19P2 リガンドまたはその誘導体の割合を測定することを特徴とする被検液中の19P2 リガンドまたはその誘導体の定量法、

（2）担体上に不溶化した19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体、標

識化された 19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体および被検液を反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の 19P2 リガンドまたはその誘導体の定量法であって、担体上に不溶化した 19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体および標識化された 19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が 19P2 リガンドまたはその誘導体の C 端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体であり、他方が配列番号：12 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち 19P2 リガンド（12-24））を認識する抗体である定量法を提供する。

より具体的には、19P2 リガンドまたはその誘導体の C 端側の部分ペプチドに特異的に反応することを特徴とする抗体が P2L-1Ca または P2L-2Ca で標示されるモノクローナル抗体であり、配列番号：12 で表されるアミノ酸配列を有する部分ペプチド（即ち、19P2 リガンド（12-24））を認識する抗体が P2L-1Ta または P2L-3Ta で標示されるモノクローナル抗体である。

【0023】

上記の定量法（2）の中でも、特に、

①担体上に不溶化した 19P2 リガンドに対する抗体および標識化された 19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が P2L-1Ca で標示されるモノクローナル抗体であり、他方が P2L-1Ta または P2L-3Ta で標示されるモノクローナル抗体であり、19P2 リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5 または配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法、

②担体上に不溶化した 19P2 リガンドに対する抗体および標識化された 19P2 リガンドまたはその誘導体に対する抗体の一方が P2L-2Ca で標示されるモノクローナル抗体であり、他方が P2L-1Ta または P2L-3Ta で標示されるモノクローナル抗体であり、19P2 リガンドが配列番号：1、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：5 または配列番号：13 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである定量法が好適である。

【0024】

以下に本発明の19P2リガンドまたはその誘導体（以下、19P2リガンドと略称する）の定量法（免疫測定法）について、より詳細に説明する。

本発明の抗体は19P2リガンドを認識することができるので、19P2リガンドの測定あるいは組織染色などによる検出を行なうことができる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また抗体分子のF(a b')₂、F a b'あるいはF a b画分などを用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、19P2リガンド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法、サンドイッチ法などが好適に用いられるが、感度、特異性の点で後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば¹²⁵I、¹³¹I、³H、¹⁴Cなどが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが、蛍光物質としては、例えばフルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが、発光物質としては、例えばルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは19P2リガンドと標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えばアガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、例えばポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコンなどの合成樹脂あるいはガラスなどが挙げられる。

【0025】

サンドイッチ法においては、不溶化した抗 19P2 リガンド抗体に被検液を反応（1 次反応）させ、さらに標識化抗 19P2 リガンド抗体を反応（2 次反応）させた後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の 19P2 リガンド量を定量することができる。1 次反応と 2 次反応は同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも 1 種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で 2 種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による 19P2 リガンドの測定法においては、1 次反応と 2 次反応に用いられる抗 19P2 リガンド抗体とは 19P2 リガンドの該抗体と結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、例えば 1 次反応で用いられる抗体が 19P2 リガンドの C 端側の部分ペプチドを認識する場合は、2 次反応で用いられる抗体は、好ましくは C 端側の部分ペプチド以外（即ち、N 端側または中間部の部分ペプチド）を認識する抗体が用いられる。

具体的に、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる 19P2 リガンドの C 端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体としては、[Cys¹⁷] ヒト 19P2 リガンド（17-31）を免疫原として作製したモノクローナル抗体が用いられる。本発明者らは、このような抗体を産生するハイブリドーマを 8 種類確立した。中でもハイブリドーマ P2L-1C が産生する抗体は、後述するパーオキシダーゼ標識化 19P2 リガンド（18-31）を用いる競合法の酵素免疫測定法において、ヒト、ウシおよびラット 19P2 リガンド（1-31）と反応した（B/B₀ = 0.5 を与える抗原濃度：3 nM、1.1 ng/well）。さらに、後述する [Cys²⁵] 19P2 リガンド（12-25）を免疫原として作製した 19P2 リガンドの中間部の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体のうち、特に P2L-1Ta と組み合わせたサンドイッチ法に用いた場合、予想外にも 19P2 リガンドをより高感度に測定できることが明らかとなった（検出感度、0.1 fmol/well）。即ち、本発明のサンドイッチ法酵素免疫測

定法に適した19P2リガンドのC端側の部分ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体は、必ずしも19P2リガンド(1-31)に対して高親和性である必要はない。このような抗体として、例えば、P2L-1Taなどが好都合に用いられる。

【0026】

一方、本発明のサンドイッチ免疫測定法に用いられる19P2リガンドの中間部の部分ペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)を免疫原として作製した抗体が好適に用いられる。本発明者らは、これらの抗体を産生するハイブリドーマを10種類作製した。これらの抗体の19P2リガンド(12-24)に対する反応性を後述するパーオキシダーゼ標識化19P2リガンド(12-24)を用いる競合法により調べたところ、4種類の抗体が19P2リガンド(12-24)に良好な反応性を有していた($B/B_0 = 0.5$ を与える抗原濃度: 1~4 nM、0.9~1.6 ng/well)が、P2L-1TaとP2L-3Taが19P2リガンド(1-31)に良好な反応性を有していた。そのなかでも特にP2L-1Taが極めて高感度のサンドイッチ測定法を与えることが明らかとなった。また、P2L-1Taは19P2リガンド(12-31)とも同程度の反応性をしめした。即ち、本発明において、サンドイッチ法に適した19P2リガンドの中間部の部分ペプチドを認識する抗体として、19P2リガンド(12-24)に対する抗体を数種類提供するが、特にP2L-1Taが好適に用いられる。

本発明のモノクローナル抗体は、サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法、ネフロメトリーなどにも用いることもができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、BおよびFいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法や、第1抗体として固相化抗体を用いるかあるいは第1抗体は可溶性のものを用い、第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法などが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0027】

これら個々の免疫学的測定法を本発明法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて19P2リガンドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる[例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70 (Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73 (Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74 (Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84 (Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92 (Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121 (Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照]。したがって、本発明のサンドイッチ免疫測定法により19P2リガンドの測定系を構築する場合、その方法は後述する実施例に限定されない。

以上のように、本発明の抗体は、19P2リガンドまたはその誘導体を感度良

く定量することができるので、19P2リガンドの生理機能の解明および19P2リガンドの関与する病態の診断等として有用である。

【0028】

本発明の明細書において、アミノ酸等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。アミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

PAM : フェニルアセタミドメチル
 Boc : t-ブチルオキシカルボニル
 Fmoc : 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル
 Cl-Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル
 Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
 Bzl : ベンジル
 Cl₂-Bzl : 2,6-ジクロロベンジル
 OcHex : シクロヘキシルエステル
 OBzl : ベンジルエステル
 Tos : p-トルエンシルホニル
 HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
 HOBt : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
 HOObt : 3-ヒドロキシ-3,4-ジヒドロ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン
 MeBzl : 4-メチルベンジル
 Bom : ベンジルオキシメチル
 Bum : t-ブトキシメチル
 Trt : トリチル
 DNP : ジニトロフェニル
 TFA : トリフルオロ酢酸
 DMF : N,N-ジメチルフォルムアミド
 DCM : ジクロロメタン

DCC : N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド

BHA : ベンズヒドリルアミン

pMBHA : p - メチルベンズヒドリルアミン

CHO : ホルミル

Gly : グリシン

Ala : アラニン

Val : バリン

Leu : ロイシン

Ile : イソロイシン

Ser : セリン

Thr : スレオニン

Cys : システイン

Met : メチオニン

Glu : グルタミン酸

Asp : アスパラギン酸

Lys : リジン

Arg : アルギニン

His : ヒスチジン

Phe : フェニルアラニン

Tyr : チロシン

Trp : トリプトファン

Pro : プロリン

Asn : アスパラギン

Gln : グルタミン

【0029】

本明細書において用いられる配列番号は、以下のペプチドのアミノ酸配列を表す。

〔配列番号：1〕 ウシ 19 P 2 リガンド (1-31)

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：2〕 ヒト 19P2 リガンド (1-31)

H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：3〕 ラット 19P2 リガンド (1-31)

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：4〕 ヒト 19P2 リガンド (17-31)

H-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：5〕 ヒト 19P2 リガンド (12-31)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-

Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：6〕 ヒト 19P2 リガンド (17-31) のジアセチル体

Ac-Pro-Ala-Trp-Tyr(Ac)-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：7〕 [Cys¹⁷] ヒト 19P2 リガンド (17-31)

H-Cys -Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：8〕 [D-Ala²⁹] ヒト 19P2 リガンド (1-31)

H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-D-Ala-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：9〕 ウシ 19P2 リガンド (1-31) Gly-Arg-OH

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-

Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-Gly-Arg-OH

〔配列番号：10〕 ウシ 19P2 リガンド (1-31) -OH

H-Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-OH

〔配列番号：11〕 ヒト 19P2 リガンド (1-30)

H-Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-

Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-NH₂

〔配列番号：12〕 [Cys²⁵] ヒト 19P2 リガンド (12-25)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Cys-NH₂

〔配列番号：13〕 ウシ 19 P 2 リガンド (12-31)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

〔配列番号：14〕 ラット 19 P 2 リガンド (12-31)

H-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂

【0030】

後述の実施例で得られた抗 19 P 2 リガンド抗体を産生するハイブリドーマ細胞のうち、P 2 L-1 C および P 2 L-1 T は平成 10 年 3 月 18 日から通商産業省工業技術院生命工学技術研究所 (NIBH) に、それぞれ以下の受託番号で寄託されている。

ハイブリドーマ細胞

FERM-BP (NIBH)

P 2 L-1 C

6299

P 2 L-1 T

6300

なお、各ハイブリドーマ細胞から得られる抗体については細胞名の後に a を付けた形で表す。

【0031】

【発明の実施の形態】

以下に、参考例および実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0032】

【実施例】

〔実施例 1〕 抗原の作成

(1) 19 P 2 リガンドの製造

【実験例 1】 ウシ 19 P 2 リガンド (1-31) の製造

1) Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Ala-His(Bom)-Gln-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin の

合成。

市販のp-メチルBHA樹脂（アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製）0.71g(0.5 mmole)をペプチド合成機（アプライド バイオシテムズ社製430A）の反応器に入れ、ジクロロメタン(DCM)で膨潤させた後、最初のアミノ酸Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。

樹脂を50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、ジイソプロピルエチルアミン(DIEA)で中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-Arg(Tos)をHOBt/DCC法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)を順次縮合、ニンヒドリンテストで縮合が不十分であると判明したBoc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)は再縮合し反応を完了した。樹脂を乾燥して半量の樹脂を取り出した残りに、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Met、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Gln、Boc-His(Bom)、Boc-Ala、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)を同様にニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%トリフルオロ酢酸(TFA)/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し1.28gのペプチド樹脂を合成した。

【0033】

2) Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂の合成。

1) で得た樹脂をp-クレゾール3.8g、1,4-ブタンジチオール1ml、弗化水素10mlと共にテフロン製弗化水素反応装置中で0℃ 60分間反応した。弗化水素、1,4-ブタンジチオール1mlを減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、ガラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約5mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25(2x90cm)のカラムに付し50%酢酸水で展開し114 ml~181 mlの画分を集め凍結乾燥し、白色粉末290 mgを得た。これをLiChroprep(RP-18(MERCK社製))を充填した逆相系カラムにつけ0.1%

TFA水と0.1% TFA含有30%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度25%前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末71mgを得た。

質量分析による (M+H) + 3574.645 (計算値 3574.847)

HPLC溶出時間 18.2分

カラム条件

カラム: Wakosil5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0034】

【実験例2】ヒト19P2リガンド (1-31) の製造

実験例1と同様にp-メチルBHA樹脂にBoc-Phe、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Glu(OcHex)、Boc-Met、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Arg(Tos)、Boc-His(Bom)、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)をニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%TFA/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し所望のペプチド樹脂を合成した。この樹脂を実験例1と同様の弗化水素処理の後、やはり同様のクロマト精製で目的のペプチドを得た。

質量分析による (M+H) + 3662.884 (計算値 3662.905)

HPLC溶出時間 17.2分

カラム条件

カラム: Wakosil5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速: 1.0 ml/分

【0035】

【実験例3】ラット19P2リガンド(1-31)の製造

実験例1の1回目のBoc-Alaと2回目のBoc-IleをBoc-Thr(Bzl)に変更して合成を進め、全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%TFA/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し所望のペプチド樹脂を得た。この樹脂を実験例1と同様に処理、精製し、Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Thr-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Thr-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂の、白色粉末を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 3622.547(3622.826)

HPLC溶出時間 17.4分

カラム条件

カラム: Wakosil(5C18 (4.6×100mm))

溶離液: A液(0.1% TFA水)

B液(0.1% TFA含有50%アセトニトリル水)を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速: 1.0 ml/分

【0036】

【実験例4】ヒト19P2リガンド(17-31)の製造

実験例2でBoc-Tyr(Br-Z)までを縮合した樹脂にさらにBoc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、を同様に縮合し、Boc-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resinを得た。これを実験例1の2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末70mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1731.9(計算値 1732.0)

HPLC溶出時間 16.1分

カラム条件

カラム: Wakosil5C18 (4.6×100mm)

溶離液：A液（0.1% TFA水）

B液（0.1% TFA含有50%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（15分）

流速： 1.0 ml/分

【0037】

【実験例5】ヒト19P2リガンド（12-31）の製造

実験例4でBoc-Proまでを縮合した樹脂にさらにBoc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OCH₂ex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)を同様に縮合し、Boc-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OCH₂ex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CH₂O)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resinを得た。これを実験例4と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 2272.1260（計算値 2272.2100）

HPLC溶出時間 16.8分

カラム条件

カラム：Wakosil 5C18（4.6×100mm）

溶離液：A液（0.1% TFA水）

B液（0.1% TFA含有50%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速： 1.0 ml/分

【0038】

【実験例6】ヒト19P2リガンド（17-31）のジアセチル体の製造

実験例4の化合物17.5mgを10%ピリジン水に溶解し、無水酢酸20μlと約60分反応後、実験例4と同様に精製し、10.7mgの粉末を得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1815.8600（計算値 1815.9743）

HPLC溶出時間 19.7分

カラム条件

カラム：Wakosil 5C18（4.6×100mm）

溶離液：A液（0.1% 水）

B液（0.1% TFA含有50%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速： 1.0 ml/分

【0039】

【実験例7】 [Cys¹⁷] ヒト19P2リガンド（17-31）の製造

実験例4の樹脂にさらにBoc-Cys(MeBzl)縮合し、これを同様に弗化水素処理、
カラム精製し、白色粉末50mgを得た。

質量分析による (M+H) + 1737.9 (計算値 1737.6)

HPLC溶出時間 17.2分

カラム条件

カラム： Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液（0.1% TFA含有水）

B液（0.1% TFA含有50%アセトニトリル水）を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出（25分）

流速： 1.0 ml/分

【0040】

【実験例8】 [D-Ala²⁹] ヒト19P2リガンド（1-31）の製造

実験例2と同様にp-メチルBHA樹脂にBoc-Phe、Boc-Arg(Tos)を順に導入
した後、Boc-GlyをBoc-D-Alaに代えて導入した。以後実験例2と同様に反応し、
Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-His(Bom)-Arg(Tos)-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-D-Ala-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resinを得た。この樹脂を実験例2と同様に処理、精製し、Ser-Arg-Thr-His-Arg-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Ser-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-D-Ala-Arg-Phe-NH₂の白色粉末を得た。

質量分析による (M+H) + 3678.6 (計算値 3679.2)

HPLC溶出時間 18.5分

カラム条件

カラム：YMC-A-301-3 ODS (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

【0041】

【実験例9】 ウシ19P2リガンド (1-31) Gly-Arg-OHの製造

市販Boc-Arg(Tos)-OCH₂PAM樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.83g(0.5 mmole)をペプチド合成機 (アプライド バイオシテムズ社製430A) の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-GlyをHOBt/DCC法で縮合した。以後実験例1と同様のBocアミノ酸を順次縮合し、全アミノ酸配列を導入した樹脂1.21gを得た。この樹脂0.59gを実験例1と同様に処理、精製して白色粉末162mgを得た。質量分析による (M+H)⁺ 3789.0105 (計算値 3788.9477)

HPLC溶出時間 16.4分

カラム条件

カラム：Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液：A液 (0.1% TFA含有水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速： 1.0 ml/分

【0042】

【実験例10】 ウシ19P2リガンド (1-31) -OHの製造

市販Boc-Phe-OCH₂PAM樹脂 (アプライド バイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.69g(0.5 mmole)を用い実験例9と同様に所望するアミノ酸配列通りに順次Bocアミノ酸を導入後、処理精製を行い、白色粉末を得た。

質量分析による (M+H)⁺ 3575.7451 (3575.8254)

HPLC 溶出時間 16.6分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA 含有水)

B液 (0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水) を用い

A液から B液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0043】

【実験例 11】 ウシ 19P2 リガンド (1-30) の製造

実験例 2 と同様に p-メチル BHA 樹脂に、Boc-Arg(Tos)、Boc-Gly、Boc-Val、Boc-Pro、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OCHEX)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ile、Boc-Glu(OCHEX)、Boc-Met、Boc-Ser(Bzl)、Boc-His(Bom)、Boc-Arg(Tos)、Boc-His(Bom)、Boc-Thr(Bzl)、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl) を順次縮合した後、同様に処理精製し、白色粉末を得た。

質量分析による (M+H) + 3517.4 (計算値 3518.0)

HPLC 溶出時間 17.5分

カラム条件

カラム: YMC-A-301-3 ODS (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA 水)

B液 (0.1% TFA 含有 50% アセトニトリル水) を用い

A液から B液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0044】

【実験例 12】 [Cys²⁵] ヒト 19P2 リガンド (12-25) の製造

実験例 2 と同様に p-メチル BHA 樹脂に、Boc-Cys(MeBzl)、Boc-Gly、Boc-Arg(Tos)、Boc-Ser(Bzl)、Boc-Ala、Boc-Tyr(Br-Z)、Boc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OCHEX)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)、を順次縮合した後、同様に処理精製し、白色粉末を得た。

質量分析による (M+H) + 1549.5 (計算値 1549.7)

HPLC 溶出時間 15.3 分

カラム条件

カラム: Wakosil(5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0045】

【実験例13】ウシ19P2リガンド (12-31) の製造

実験例1でBoc-Tyr(Br-Z)までを縮合した樹脂にさらにBoc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)を同様に縮合し、Boc-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin 1.14 gを得た。これを実験例1の2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60 mgを得た。

質量分析による (M+H) + 2242.149 (計算値 2242.200)

HPLC 溶出時間 10.4 分

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有15%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有45%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (15分)

流速: 1.0 ml/分

【0046】

【実施例2】免疫原の作製

(1) 19P2リガンド(18-31)を含む免疫原の作製

上記実施例1 (実験例7) で得られた [Cys¹⁷] 19P2リガンド(17-31) と牛チログロブリン (BTG) との複合体を作製し、免疫原とした。即ち、BT

G 20 mg を、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.4 ml に溶解させ、N- γ -マレイミドブチロキシ) サクシニミド (GMB S) 2.2 mg ($8 \mu\text{mol}$) を含む DMF 溶液 $100 \mu\text{l}$ と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BTG 15 mg と [Cys¹⁷] 19 P 2 リガンド (18-31) 1.6 mg とを混合し、4℃で 2 日間反応させた。反応後、生理食塩水に対し、4℃で 2 日間透析した。

(2) 19 P 2 リガンド (12-24) を含む免疫原の作製

上記実施例 1 (実験例 12) で得られた [Cys²⁵] 19 P 2 リガンド (12-25) と BTG との複合体を作製し、免疫原とした。即ち、BTG 21 mg を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1.4 ml に溶解させ、GMB S 2.35 mg ($8.4 \mu\text{mol}$) を含む DMF 溶液 $100 \mu\text{l}$ と混合し、室温で 40 分反応させた。反応後、セファデックス G-25 カラムで分画したのち、マレイミド基の導入された BTG 15 mg と [Cys²⁵] 19 P 2 リガンド (12-24) 3.8 mg とを混合し、4℃で一晩反応させた。反応後、生理食塩水に対し 4℃で 3 日間透析した。

【0047】

〔実施例 3〕 免疫

6~8 週令の BALB/C 雌マウスに上記実施例 2 記載の免疫原 [Cys¹⁷] 19 P 2 リガンド (17-31)-BTG 複合体および [Cys²⁵] 19 P 2 リガンド (12-25)-BTG 複合体を、それぞれ約 $20 \mu\text{g}$ /匹を完全フロイントアジュバントとともに皮下免疫した。以後 3 週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに 2~3 回追加免疫した。

【0048】

〔実施例 4〕 酵素標識化抗原の作製

(1) 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識化 19 P 2 リガンド (18-31) の作製

上記実施例 1 (実験例 7) で得られた [Cys¹⁷] 19 P 2 リガンド (17-31) と HRP (酵素免疫測定法用、ベーリンガー・マンハイム社製) とを架橋し、酵素

免疫測定法 (EIA) の標識体とした。即ち、HRP 6mg (150nmol) を0.95mlの0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5に溶解させ、GMB S0.42mg (1.5 μ mol) を含むDMF溶液50 μ lと混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入されたHRP4.2mg (105nmol) と実施例1(7)で作製された[Cys¹⁷]19P2リガンド(18-31)0.55mg (315nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA44 (LKB-ファルマシア社製) カラムで分画し、HRP標識化19P2リガンド(18-31)を得た。

(2) HRP標識化19P2リガンド(12-24)の作製

上記実施例1(実験例12)で得られた[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)とHRPとを架橋し、EIAの標識体とした。即ち、HRP6mg (150nmol) を1.4mlの0.1Mリン酸緩衝液、pH6.5に溶解させ、GMB S0.42mg (1.5 μ mol) を含むDMF溶液100 μ lと混合し、室温で30分間反応させたのち、セファデックスG-25カラムで分画した。このようにして作製した、マレイミド基の導入されたHRP4.2mg (105nmol) と実施例1(12)で作製された[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)0.48mg (315nmol) とを混合し、4℃で1日反応させた。反応後ウルトロゲルAcA44カラムで分画し、HRP標識化19P2リガンド(12-24)を得た。

【0049】

〔実施例5〕抗体価の測定

(1) [Cys¹⁷]19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

[Cys¹⁷]19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートを作製するため、まず抗マウスイムノグロブリン抗体(IgG画分、カッペル社製)を100 μ g/ml含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100 μ lずつ分注し、4℃で24時間放置した

。次に、プレートを用リン酸緩衝生理食塩水（PBS、pH7.4）で洗浄したのち、ウェルの余剰の結合部位をふさぐため25%ブロッカー（雪印乳業社製）を含むPBSを300 μ lずつ分注し、4℃で少なくとも24時間処理した。

上記、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートの各ウェルにバッファC [1%BSA、0.4M NaCl、および2mM EDTAを含む0.02Mリン酸緩衝液、pH7.0] 50 μ l、バッファCで希釈したマウス抗[Cys¹⁷]19P2リガンド(17-31)-BTG抗血清100 μ lを加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4(1)で作製したHRP標識化19P2リガンド(18-31)（バッファCで300倍希釈）100 μ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム（KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い）100 μ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100 μ lを加え停止させたのち、450nmの吸収をプレートリーダー（BICHROMATIC、大日本製薬社製）で測定した。結果を〔図1〕に示す。免疫した8匹のマウス全てに19P2リガンド(18-31)に対する抗体価の上昇が認められた。

(2) [Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウスの抗血清中の抗体価の測定

[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫中のマウス抗血清中の抗体価を同様の方法により測定した。バッファCで希釈したマウス抗[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)-BTG抗血清100 μ lを加え4℃で16時間反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、上記実施例4(2)で作製したHRP標識化19P2リガンド(12-24)（バッファCで500倍希釈）100 μ lを加え室温で1日反応させた。次に、該プレートをPBSで洗浄したのち、固相上の酵素活性をTMBマイクロウェルパーオキシダーゼ基質システム（KIRKEGAARD&PERRY LAB, INC、フナコシ薬品取り扱い）100 μ lを加え室温で10分間反応させることにより測定した。反応を1Mリン酸100 μ lを加え停止させたのち、450nmの吸収をプレートリーダー（BICHROMA

TIC、大日本製薬社製)で測定した。結果を〔図2〕に示す。免疫した8匹のマウス全てに19P2リガンド(12-24)に対する抗体価の上昇が認められた。結果を〔図2〕に示す。免疫した8匹のマウスのうち3匹に比較的高い抗体価が認められた。

【0050】

〔実施例6〕モノクローナル抗19P2リガンド抗体の作製

比較的高い抗体価を示したマウスに対して200~300 μ gの免疫原を生理食塩水0.25~0.3mlに溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なった。最終免疫3~4日後のマウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫、ろ過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメデイウム(MEM)に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB/Cマウス由来ミエローマ細胞P3-X63.Ag8.U1(P3U1)を用いた〔カレント トピックス イン マイクロバイオロジー アンド イムノロジー、81、1(1978)〕。細胞融合は、原法〔ネイチャー、256、495(1975)〕に準じて行なった。即ち、脾臓細胞およびP3U1をそれぞれ血清を含有しないMEMで3度洗浄し、脾臓細胞とP3U1数の比率を10:1になるよう混合して、800回転で15分間遠心を行なって細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、45%ポリエチレングリコール(PEG)6000(コッホライト社製)を0.3ml加え、37℃温水槽中で7分間静置して融合を行なった。融合後細胞に毎分2mlの割合でMEMを添加し、合計15mlのMEMを加えた後600回転15分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を10%牛胎児血清を含有するGITメデイウム(和光純薬)(GIT-10%FCS)にP3U1が1ml当り 2×10^5 個になるように浮遊し、24穴マルチディッシュ(リンプロ社製)に1ウェル1mlずつ192ウェルに播種した。播種後、細胞を37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中で培養した。24時間後HAT(ヒポキサンチン 1×10^{-4} M、アミノプテリン 4×10^{-7} M、チミジン 1.6×10^{-3} M)を含んだGIT-10%FCS培地(HAT培地)を1ウェル当り1mlずつ添加することにより、HAT選択培養を開始した。HAT選択培養は、培養開始3、6、9日後に旧液を1ml捨てたあと、1mlのHAT培

地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後9～14日で認められ、培養液が黄変したとき（約 1×10^6 セル/ml）、上清を採取し、実施例5に記載の方法に従って抗体価を測定した。

[Cys¹⁷] 19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫したマウス由来のハイブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウスNo.6（図1参照）を用いて得られた結果を〔図3〕に示した。これらも含め計2種類のハイブリドーマを選択した〔表1〕。

【0051】

【表1】

抗ヒト19P2リガンド(18-31)モノクローナル抗体の反応性

反 応 性 1)					
ハイブリドーマ株 No.	h(1-31)n	h(1-31)-OH	b(1-31)n	クラス/サブクラス	備考
1	+	-	+	IgG1, κ	P2L-1C
2	+	+	±		
3	+	-	+		
4	+	+	±	IgG1, κ	P2L-2C
5	±	-	±		
6	+	+	±	IgG1, κ	
7	+	-	+	IgG1, κ	
8	+	-	+	IgG1, κ	

1) h(1-31)nはヒト19P2-L31、h(1-31)-OHはヒト19P2リガンド(1-31)-OHおよびb(1-31)nはウシ19P2-L31を表す。

2) 100 nMの抗原[ヒト19P2-L31、ヒト19P2リガンド(1-31)-OH、ウシ19P2-L31]が存在した時

+

(B/B₀) < 0.50

±

0.50 ≤ (B/B₀) < 0.80

-

0.80 ≤ (B/B₀)

ただし、B : 抗原存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)量

B₀ : 抗原非存在時の抗体に結合したHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)量

【0052】

[Cys²⁵] 19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウス由来のハイ

ブリドーマのスクリーニングの典型例として、マウス No. 1 (図 2 参照) を用いて得られた結果を [図 4] に示した。これらも含め計 3 種類のハイブリドーマを選択した [表 2]。

【0053】

【表 2】

抗ヒト 19P2 リガンド (12-24) モノクローナル抗体の反応性

反 応 性 1)					
Mブドーマ株 No.	h(1-31)n	h(12-31)n	r(1-31)n	クラス/サブクラス	備考
1	+	+	+	IgG2b, κ	P2L-1T
2	+	+	+	IgG1, κ	P2L-3T
3	+	+	±	IgG1, κ	P2L-2T
4	±	±	±		
5	+	+	±		
6	+	+	+	IgG1, κ	P2L-4T
7	-	-	±		
8	±	±	±		
9	-	-	±		
10	±	+	±		
11	+	+	±		
12	-	-	±		

1) h(1-31)n はヒト 19P2-L31、h(12-31)n はヒト 19P2-L20 および r(1-31)n はラット 19P2-L31 を表す。

2) 10 nM の抗原 [ヒト 19P2-L31、ヒト 19P2-L20、ラット 19P2-L31] が存在した時

+: $(B/B_0) < 0.50$

±: $0.50 \leq (B/B_0) < 0.75$

-: $0.75 \leq (B/B_0)$

ただし、B: 抗原存在時の抗体に結合した HRP 標識化ヒト 19P2 リガンド (12-24) 量

B₀: 抗原非存在時の抗体に結合した HRP 標識化ヒト 19P2 リガンド (12-24) 量

【0054】

次に、これらのハイブリドーマを限界希釈法によるクローニングに付した。クローニングに際しては、フィーダー細胞として BALB/C マウスの胸腺細胞をウェル当り 5×10^5 個になるように加えた。クローニング後、ハイブリドーマを、あらかじめミネラルオイル 0.5 ml を腹腔内投与されたマウス (BALB

／C)に $1 \sim 3 \times 10^6$ セル／匹を腹腔内投与したのち、6～20日後に抗体含有腹水を採取した。

モノクローナル抗体は得られた腹水よりプロテイン-Aカラムにより精製した。即ち、腹水6～20mlを等量の結合緩衝液(3.5M NaCl、0.05%NaN₃を含む1.5Mグリシン、pH9.0)で希釈したのち、あらかじめ結合緩衝液で平衡化したリコンビナントプロテイン-A-アガロース(Repligen社製)カラムに供し、特異抗体を溶離緩衝液(0.05%NaN₃を含む0.1Mクエン酸緩衝液、pH3.0)で溶出した。溶出液はPBSに対して4℃、2日間透析したのち、0.22μmのフィルター(ミリポア社製)により除菌濾過し4℃あるいは-80℃で保存した。モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定に際しては、精製モノクローナル抗体結合固相を用いるエンザイム-リンクドイムノソーベントアッセイ(ELISA)法を行った。即ち、抗体2μg/mlを含む0.1M炭酸緩衝液、pH9.6溶液を96ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、4℃で24時間放置した。上記実施例5で述べた方法に従って、ウェルの余剰の結合部位をブロックエースでふさいだのち、アイソタイプタイピングキット(Mouse-Typer™ Sub-Isotyping Kit バイオラッド社製)を用いるELISAによって固相化抗体のクラス、サブクラスを調べた。

【0055】

〔実施例7〕競合法酵素免疫測定法

(1) 競合法-EIA(その1)

[Cys¹⁷]19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体の反応特異性を以下の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例5(1)記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約50%となる抗体濃度(約30～50ng/ml)を決定した。次に、上記実施例5記載の抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50μl、ヒト、ラットおよびウシ19P2リガンド(1-31)あるいは19P2リガンド部分ペプチド、即ちヒト19P2リガンド(1-30)、ヒト[D-Ala²⁹]-19P2リガンド(1-31)、ヒト19P

2リガンド(20-31)、ウシ19P2リガンド(1-31)-OH、ウシ19P2リガンド(1-31)-Gly-Arg-OHのバッファ- C溶液50 μ l、および上記実施例4(1)記載HRP標識化19P2リガンド(18-31)(バッファ- Cで400倍希釈)を50 μ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例5(1)記載の方法により測定した。結果を〔表1〕に示す。いずれの抗体もHRP標識化19P2リガンド(18-31)と反応し、またヒト19P2リガンド(1-31)に対しても反応性を有していた〔表1〕。当初選択したモノクローナル抗体4種類のうちのうち2種類がウシおよびラット19P2リガンド(1-31)とも同定度に反応した。典型例として、これらの中でヒト、ラットおよびウシ19P2リガンド(1-31)に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体P2L-1Ca(IgG1, κ)の競合法-EIAの結果を〔図5(a)〕に示す。これらの抗体がヒト、ラットおよびウシ19P2リガンド(1-31)に対して同程度の反応性を有することが分かる。P2L-1Cのヒト19P2リガンド(1-31)の標準曲線から、 $(B/B_0) = 0.5$ を与える19P2リガンド(1-31)の濃度は、3nM、1.1ng/wellであることが分かった。また、この抗体はP2L-1Cは、ヒト[D-Ala²⁹]-19P2リガンド(1-31)との反応性は弱いながらも示すもの、ヒト19P2リガンド(1-30)、ウシ19P2リガンド(1-31)-OHおよびウシ19P2リガンド(1-31)Gly-Arg-OHに対しては交差反応性を示さないことから、19P2リガンド(1-31)のC端部分の部分構造を認識し、31残基目のPheとC末端のアミドを認識することが分かった〔図6(a)〕。一方、P2L-2Cを用いた場合の競合法-EIAの結果を〔図5(b)〕に示した。P2L-2C(IgG1, κ)のヒト19P2リガンド(1-31)に対する反応性 $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 1.5nM、0.5ng/well)は、ウシ19P2リガンド(1-31)に対する反応性 $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 50nM、18ng/well)の33倍、ラット19P2リガンド(1-31)に対する反応性 $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度: 200nM、73ng/well)の130倍であることが分かった。これらの結果から、P2L-2Cは、ヒト、ウシ、

ラットで配列の異なる19P2リガンド(1-31)の21残基のAlaおよび22残基のSerを強く認識しているものと考えられる。

【0056】

(2) 競合法-EIA (その2)

抗[Cys²⁵]19P2リガンド(12-25)-BTGモノクローナル抗体の反応特異性を同様の方法により調べた。まず、各モノクローナル抗体溶液の抗体価を実施例5(2)記載の方法により調べ、競合法-EIAに用いる抗体濃度として、標識体の結合量が飽和結合量の約50%となる抗体濃度(約30~50 ng/ml)を決定した。次に、抗マウスイムノグロブリン抗体結合マイクロプレートに、決定された濃度にバッファーCで希釈された抗体溶液50 μ l、ヒトおよびラット19P2リガンド(1-31)あるいは19P2リガンド部分ペプチド、即ちヒト19P2リガンド(12-31)、ヒト19P2リガンド(17-31)およびヒト19P2リガンド(17-31)のジアセチル体のバッファーC溶液50 μ l、および上記実施例4(2)記載HRP標識化19P2リガンド(12-24)(バッファーCで500倍希釈)を50 μ l加え、4℃で16時間反応させた。反応後、PBSで洗浄したのち固相上の酵素活性を上記実施例5(1)記載の方法により測定した。結果を〔表2〕に示す。いずれの抗体もHRP標識化19P2リガンド(12-31)と反応し、またヒト19P2リガンド(1-31)およびラット19P2リガンド(1-31)に対しても反応性を有していた。典型例として、これらの中でヒトあるいはラット19P2リガンド(1-31)に対して最も高い反応性を示したモノクローナル抗体として、P2L-1Ta(IgG_{2b}, κ)あるいはP2L-3Ta(IgG₁, κ)の競合法-EIAの結果を〔図7〕に示す。P2L-1Taのヒト19P2リガンド(1-31)の標準曲線から、(B/B₀)=0.5を与えるヒト19P2リガンド(1-31)濃度は、4 nM、1.6 ng/wellであることが分かった。さらに、P2L-1Taの19P2リガンド(12-31)に対する反応性((B/B₀)=0.5を与える抗原濃度: 4 nM、0.88 ng/well)はヒト19P2リガンド(1-31)と同程度、ラット19P2リガンド(1-31)に対する反応性((B/B₀)=0.5を与える抗原濃度: 1 nM、0.4 ng/well)

は、4倍であることが分かった〔図7(a)〕。一方、P2L-3Taの19P2リガンドに対する反応性は、 $(B/B_0) = 0.5$ を与えるヒト19P2リガンド(1-31)濃度は、4 nM、1.6 ng/wellであることが分かった。さらに、P2L-1Taの19P2リガンド(12-31)に対する反応性 $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度：7 nM、1.54 ng/well)はヒト19P2リガンド(1-31)の1/2、ラット19P2リガンド(1-31)に対する反応性 $(B/B_0) = 0.5$ を与える抗原濃度：25 nM、0.4 ng/well)は、6倍であることが分かった〔図7(b)〕。また、いずれの抗体はともに、ヒト19P2リガンド(17-31)および2Ac-ヒト19P2リガンド(17-31)に対しては交差反応性を示さないことから、19P2リガンド(12-16)の部分構造を認識することが分かった〔図8〕。また、〔図9〕に、これら2種類の抗体に加え、当初選択したヒト19P2リガンド(1-31)に対して高い反応性を示したモノクローナル抗体2種類、P2L-2TaおよびP2L-4Taを用いた競合法-EIAにおけるヒト19P2リガンド(1-31)の標準曲線を示した。これら抗体の $(B/B_0) = 0.5$ を与えるヒト19P2リガンド(1-31)の濃度は、3~50 nMの範囲にあり、その中でP2L-1Taを用いる競合法-EIAが最も高感度であり、約0.1 nM [$(B/B_0) = 0.9$]のヒト19P2リガンド(1-31)が検出可能であった。

【0057】

〔実施例8〕HRP標識化抗19P2リガンドモノクローナル抗体の作製

(1) P2L-1Ta-HRP

P2L-1Ta精製画分18 mg (120 nmol)を含む0.1 Mリン酸緩衝液、pH 6.8溶液にGMB S1.43 μ molを含むDMF 50 μ lを加え、室温で40分反応させた。反応液をセファデックスG-25カラム(溶離液、0.1 Mリン酸緩衝液、pH 6.7)で分離し、マレイミド基の導入された抗体画分13 mgを得た。次に、HRP 15.5 mg (387 nmol)を含む0.02 Mリン酸緩衝液(0.15 M NaClも含む)、pH 6.8、1.4 mlにN-スクシニミジル-3-(2-ピリミジルジチオ)プロピオネート(SP

DP) $5.8 \mu\text{mol}$ を含む DMF $60 \mu\text{l}$ を加え、室温で40分反応させた。次に、 $68 \mu\text{mol}$ のジチオスレイトールを含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 0.4ml を加え、室温で20分反応させた後セファデックス G-25 カラム (溶離液、 2mM EDTA を含む 0.1M リン酸緩衝液、pH 6.0) で分離し、SH 基の導入された HRP 11mg を得た。次に、SH 基の導入された HRP 8mg とマレイミド基の導入された抗体画分 3mg とを混合し、コロジオンバッグ (ザルトリウス社製) で約 0.5ml にまで濃縮したのち、 4°C で16時間放置した。反応液を溶離液に 0.1M リン酸緩衝液、pH 6.5 を用いる Sephacryl S-300 HR カラム (Pharmacia 社製) に供し、P2L-1Ta-HRP 複合体画分を精製した。

(2) P2L-3Ta-HRP

同様の方法により、P2L-3Ta 精製画分 15mg と HRP 16mg を用いて P2L-3T-HRP 複合体を作製した。

【0058】

〔実施例9〕 サンドイッチ法-EIA

(1) P2L-1Ta-HRP を用いる サンドイッチ法-EIA の特異性と感度

上記実施例6記載の精製したモノクローナル抗体 P2L-1C を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む 0.1M 炭酸緩衝液、pH 9.6 溶液を96ウェルマイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で24時間放置した。ウェルの余剰の結合部位を PBS で4倍希釈したブロックエース $400 \mu\text{l}$ を加え不活化した。

以上のように調製したプレートに、バッファー EC [10% ブロックエース、0.2% BSA、 0.4M NaCl、0.05% CHAPS [3-[(コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸] を含む 0.02M リン酸緩衝液、pH 7] で希釈した19P2リガンド (1-31) 標準液 $100 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で24時間反応させた。PBS で洗浄したのち、上記実施例8で作製した P2L-1Ta-HRP (バッファー C で20,000倍希釈) $100 \mu\text{l}$ を加え、 4°C で24時間反応させたが、標識体濃度としては30,000倍希釈のものを用いた。PBS で洗浄したのち、上記実施例5記載の方法により TMB を用いて固相上の酵素活性を測定した (酵素反応20分)。結果を〔図10〕に示

すように、極めて高感度に19P2リガンド(1-31)を検出することがわかった。即ち、このサンドイッチ法-EIAは、ヒト19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を0.1 fmol/wellで、ウシ19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を0.1 fmol/wellで、ラット19P2リガンド(1-31)を0.03 fmol/wellで検出することが可能であり、他の視床下部ペプチドTRH、LHRH、GHRH、CRF、SSTおよびOxytocinは全く検出しなかった〔図11〕。したがって、固相抗体としてP2L-1Cを用い、標識体としてP2L-1Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAは、種にかかわらず19P2リガンド(1-31)および19P2リガンド(12-31)を極めて高感度にかつ極めて選択的に検出することが可能であるとわかった。

【0059】

(2) P2L-3Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性と感度
固相抗体としてP2L-1Caを用い、標識体として上記実施例8(2)で作製したP2L-3Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAの特異性および感度を調べた。上記実施例9(1)と同様にヒト19P2リガンド(1-31)、19P2リガンド(12-31)およびラット19P2リガンド(1-31)に対する反応性を調べたが、標識体濃度としては、1,000倍希釈のものを用いた〔図12〕。その結果、P2L-3Ta-HRPを用いたサンドイッチ法-EIAは、ヒト19P2リガンド(1-31)を0.3 fmol/wellで、19P2リガンド(12-31)を1 fmol/wellで、ラット19P2リガンド(1-31)を3 fmol/wellで検出可能であったが、P2L-1Ta-HRPを用いるサンドイッチ法-EIAと比較して、3-10倍感度が低いものであった。

【0060】

〔実施例10〕 P2L-1Caによる19P2リガンド(1-31)の生物活性の中和作用

P2L-1Caによる19P2リガンド(1-31)に対する中和活性を19P2レセプター発現CHO細胞を用いたアラキドン酸代謝物放出活性測定系により測定した。即ち、P2L-1Ca、P2L-3Caおよびコントロール抗体と

してP2L-1Caと同じIgGサブクラス構造(IgG1, κ)である抗エンドセリンモノクローナル抗体(AwETN40)を各濃度に希釈し、ラット19P2リガンド(1-31) (5×10^{-10} M)と室温で1時間インキュベーション後、残存活性を19P2レセプター発現CHO細胞を使用して測定した。アラキドン酸代謝物放出活性の測定は、19P2レセプター発現CHO細胞を、24 well plateに 0.5×10^5 cells/wellでまきこみ、24時間培養後、 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸を $0.5 \mu\text{Ci/well}$ となるように添加した。 $[^3\text{H}]$ アラキドン酸添加24時間後、細胞を0.1%BSAを含むMEMで洗浄後、上述の各モノクローナル抗体とラット19P2リガンド(1-31)混和溶液を $500 \mu\text{l/well}$ で添加した。37℃で1時間インキュベーションした後に、反応液 $500 \mu\text{l}$ 中 $400 \mu\text{l}$ をシンチレーター4mlに加え、反応液中に遊離された $[^3\text{H}]$ アラキドン酸代謝物の量をシンチレーション・カウンターによりモニターした(図13)。その結果、P2L-1Caは、19P2リガンド(1-31)の活性を 5×10^{-10} Mで75%、 5×10^{-9} Mで100%抑制した(図13a)。一方、P2L-2Caは、19P2リガンド(1-31)の活性を 5×10^{-8} Mで40%程度の抑制がみられたのみであった(図13b)。以上のことから、P2L-1Caは、19P2リガンド(1-31)のアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが明らかとなった。

【0061】

〔実施例11〕 血漿中の19P2リガンド(1-31)の定量

ラット血漿(1ml)をSep-Pak Plus C18カートリッジ265mg(Waters社製)で濃縮・前処理した後、19P2リガンド(1-31)を上記実施例9記載サンドイッチ-EIAにより定量した。血漿の前処理方法は、まず4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4ml、蒸留水4ml、4%酢酸4mlを順次ながして活性化したSep-Pak Plus C18カートリッジに3mlの4%酢酸を添加し酸性化させた血漿1mlを負荷する。添加後、10mlの蒸留水で洗浄後、4%酢酸含有86%エタノール4ml、メタノール4mlで溶出し、37℃の窒素ガス気流下で濃縮する。濃縮画分を0.25mlのバッファーC中で再構成しサンドイッチ-EIAにより定量した。

結果を〔表 3〕に示した。ラット血漿中には $0.2 \pm 0.03 \text{ fmol/ml}$ (mean \pm SEM, n=8) の 19P2 リガンド (1-31) が存在することが分かった。

【表 3】

ラット血漿中の 19P2 リガンドの定量

反 応 性 1)	
ラット No.	免疫反応性 19P2 リガンド (fmol/ml)
1	0.25
2	0.11
3	0.21
4	0.21
5	0.10
6	0.05
7	0.04
8	0.19
9	0.21
10	0.13
mean \pm SD	0.15 \pm 0.07

【0062】

〔実施例 12〕 ラット血漿中の 19P2 リガンドの逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による検出

上記実施例 11 記載ラット血漿中に含まれる 19P2 リガンド分子種を同定するため、ラット血漿 50 ml を上記実施例 11 記載の方法で部分精製し、この溶出面分を濃縮後 ODS-80 TM を用いる逆相 HPLC によって分画した。

カラム条件

カラム：ODS-80 TM (4.6 x 250 mm)

溶離液：A 液 (0.05% トリフルオロ酢酸含有 5% アセトニトリル)

B液(0.05%トリフルオロ酢酸含有 60%アセトニトリル)
)

溶出方法: 溶離液Bの濃度を最初の5分間に0%から35%まで上昇させ、
次に30分間かけて35-48%に直線的に上昇させた。

流速: 1.0 ml/分

分画: 0.5 ml/tube

溶出画分を減圧下、遠心濃縮乾固したのち、250 mlのバッファーCに溶解させ、上記実施例10記載のサンドイッチEIAに供した。結果を図14に示す。
血漿中の19P2リガンドの免疫活性はほとんど合成19P2リガンド(1-31)の溶出位置に検出されたことから、該サンドイッチ法-EIAが19P2リガンド(1-31)を検出していることが確認された。従って、本測定系は血漿中の19P2リガンドの変動を研究する際の重要な手段を提供すると考えられる。

【0063】

【発明の効果】

本発明の19P2リガンドに対するモノクローナル抗体(特に、P2L-1Ca)は、極めて高い結合能を有し、かつ19P2リガンドのアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが出来る。従って、19P2リガンドが有すると考えられる下垂体機能調節作用(例えば、プロラクチン分泌促進作用)、中枢神経調節作用、脾臓機能調節作用などに、異常がある場合の各種疾患の診断薬、予防薬、治療薬などに用いることができる。

本発明のモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法(特に、該モノクローナル抗体と19P2リガンドの中間部を認識する抗体とを用いるサンドイッチ法)による免疫学的測定法により、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度かつ特異的に定量することができる。この定量方法は19P2リガンドまたはその誘導体の生理機能の解明に用いることができる。

【0064】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

20

25

30

【配列番号：2】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

20

25

30

【配列番号：3】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5 10 15
Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

20 25 30

【配列番号：4】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

5 10 15

【配列番号：5】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro

5 10 15

Val Gly Arg Phe-NH₂

20

【配列番号：6】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ac-Pro Ala Trp Tyr(Ac) Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

5 10 15

【配列番号：7】

配列の長さ： 15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Cys Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-NH₂

15

【配列番号：8】

配列の長さ： 3 1

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val (D)Ala Arg Phe-NH₂

30

【配列番号：9】

配列の長さ： 3 3

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly

30

Arg-OH

【配列番号：10】

配列の長さ：31

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe-OH

20

25

30

【配列番号：11】

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn

5

10

15

Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg-NH₂

20

25

30

【配列番号：12】

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Cys-NH₂

5

10

【配列番号：13】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro

5

10

15

Val Gly Arg Phe-NH₂

20

【配列番号：14】

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro

5

10

15

Val Gly Arg Phe-NH₂

20

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、[Cys¹⁷]ヒト19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫したマウスの抗体価をHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)を用いて調べた結果を示す。

【図2】図2は、[Cys²⁵]ヒト19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウスの抗体価をHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24)を用いて調べた結果を示す。

【図3】図3は、[Cys¹⁷]ヒト19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫したマウスを用いた場合の細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングの典型

例を示す。

【図4】図4は、[Cys²⁵]ヒト19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫したマウスを用いた場合の細胞融合後のハイブリドーマのスクリーニングの典型例を示す。

【図5】図5(a)および(b)は、それぞれ[Cys¹⁷]ヒト19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体P2L-1CaおよびP2L-2Caの19P2リガンド(1-31)(ヒト)(-○-)、(ラット)(-△-)および(ウシ)(-□-)に対する反応性をHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

【図6】図6(a)は、[Cys¹⁷]ヒト19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体P2L-1Caのヒト19P2リガンド(1-31)(-●-)、ヒト19P2リガンド(20-31)(-■-)、ヒト19P2リガンド(1-30)(-▲-)、および[D-Ala²⁹]ヒト19P2リガンド(1-31)(-◆-)に対する反応性を、図6(b)は、P2L-1Caのウシ19P2リガンド(1-31)(-○-)、ウシ19P2リガンド(1-31)-OH(-□-)、およびウシ19P2リガンド(1-31)Gly-Arg-OH(-△-)に対する反応性をHRP標識化ヒト19P2リガンド(18-31)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

【図7】図7(a)および(b)は、それぞれ[Cys²⁵]ヒト19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体P2L-1TaおよびP2L-3Taの19P2リガンド(1-31)(ラット)(-●-)、(ヒト)(-■-)、およびヒト19P2リガンド(12-31)(-□-)に対する反応性をHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24)を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

【図8】図8(a)および(b)は、それぞれ[Cys²⁵]ヒト19P2リガンド(12-25)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体P2L-1TaおよびP2L-3Taのヒト19P2リガンド(1-31)(-■-)、ヒト19P2リガンド(12-31)(-□-)、ヒト19P2リガンド(17-31

) (—△—) およびヒト19P2リガンド(17-31) (—○—) のジアセチル体に対する反応性をHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24) を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

【図9】図9はP2L-1Ta (—●—)、P2L-2Ta (—○—)、P2L-3Ta (—△—) およびP2L-4Ta (—□—) に対する反応性をHRP標識化ヒト19P2リガンド(12-24) を用いる競合法-EIAで調べた結果を示す。

【図10】図10は、酵素標識抗体としてP2L-1Ta-HRPを用い、固相抗体としてP2L-1Caを用いたサンドイッチ法-EIAの、ラット19P2リガンド(1-31) (—■—)、ヒト19P2リガンド(1-31) (—●—)、ヒト19P2リガンド(12-24) (—○—)、ウシ19P2リガンド(1-31) (—▲—) あるいはウシ19P2リガンド(12-31) (—△—) の標準曲線を示す。

【図11】図11は、酵素標識抗体としてP2L-1Ta-HRPを用い、固相抗体としてP2L-1Caを用いたサンドイッチ法-EIAの、ラット19P2リガンド(1-31) (—●—) あるいは他のペプチドFMRF-Amide (—■—)、CGRP (—▲—)、TRH (—◆—)、LHRH (—○—)、GHRH (—□—)、CRF (—△—)、SST (—◇—)、Oxytosin (—●—)、VIP (—■—) およびPACAP (—▲—) との反応性を示す。

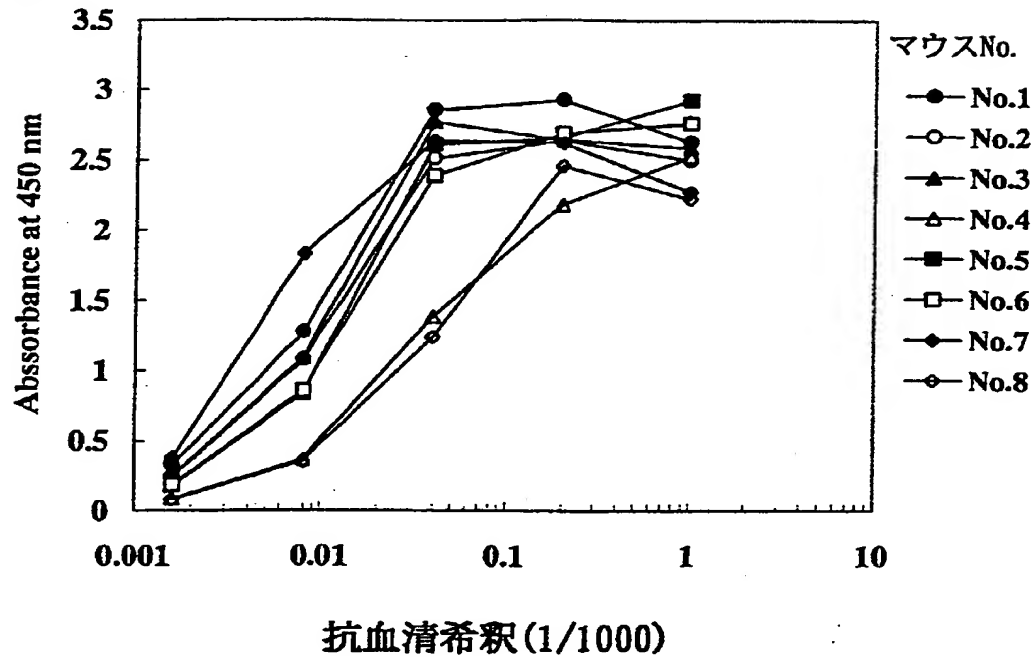
【図12】図12は、酵素標識抗体としてP2L-3Ta-HRPを用い、固相抗体としてP2L-1Caを用いたサンドイッチ法-EIAの、ラット19P2リガンド(1-31) (—■—)、ヒト19P2リガンド(12-31) (—○—) およびヒト19P2リガンド(1-31) (—●—) の標準曲線を示す。

【図13】図13(a) および(b) は、それぞれ[Cys¹⁷]ヒト19P2リガンド(17-31)-BTGを免疫原として作製したモノクローナル抗体P2L-1CaおよびP2L-2Caのラット19P2リガンド(1-31) の19P2発現CHO細胞からのアラキドン酸代謝物放出活性に対する中和作用を示す。

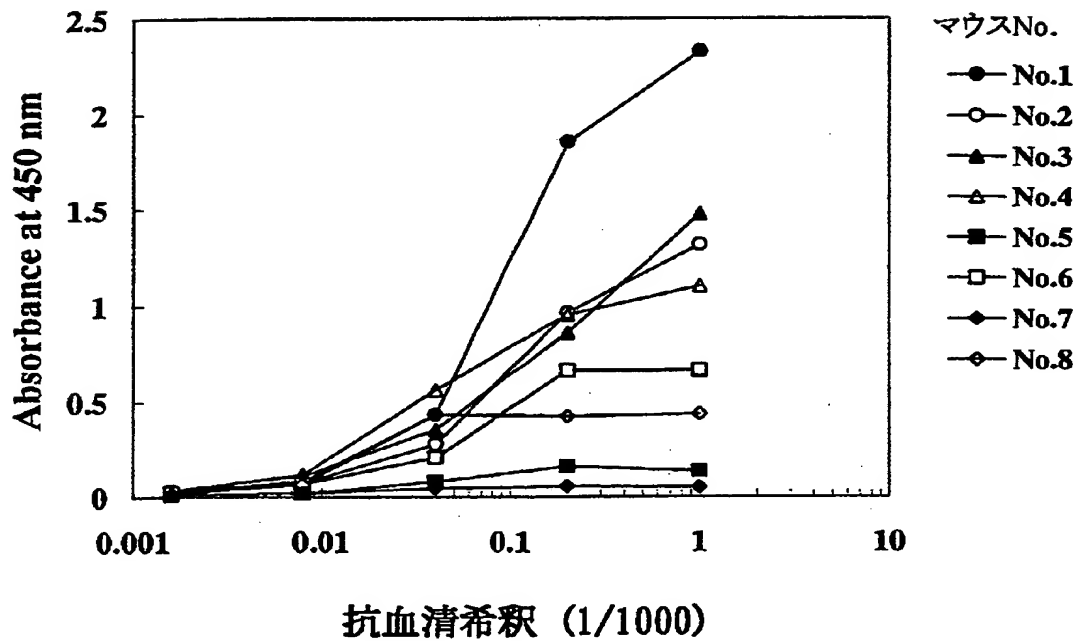
【図14】図16は、ラット血漿中の19P2リガンドの逆相-HPLCによる溶出画分の免疫活性を、酵素標識抗体としてP2L-1Ta-HRPを用い、固相用抗体としてP2L-1Caを用いるサンドイッチ-EIAによって定量した結果を示す。

【書類名】 図面

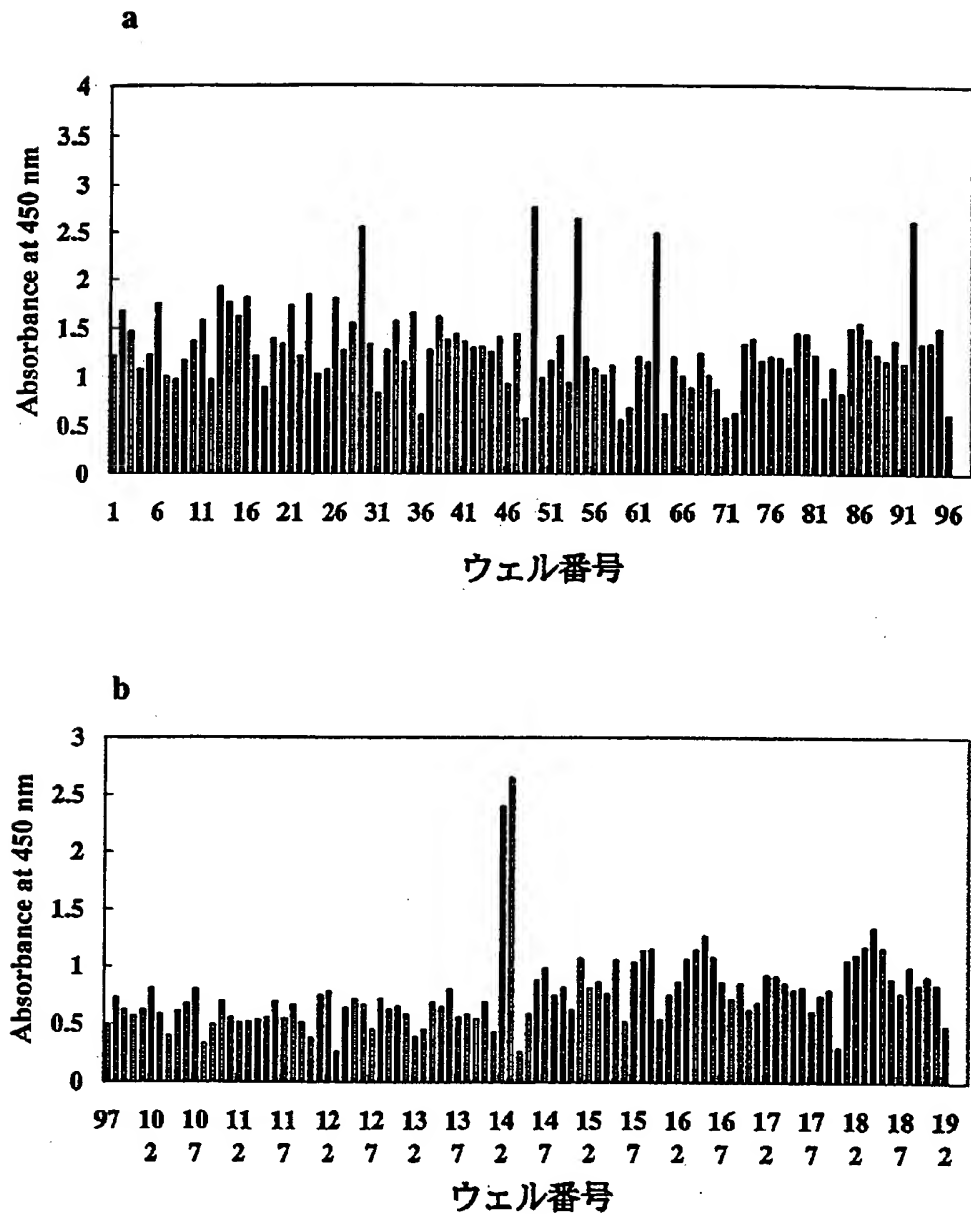
【図 1】



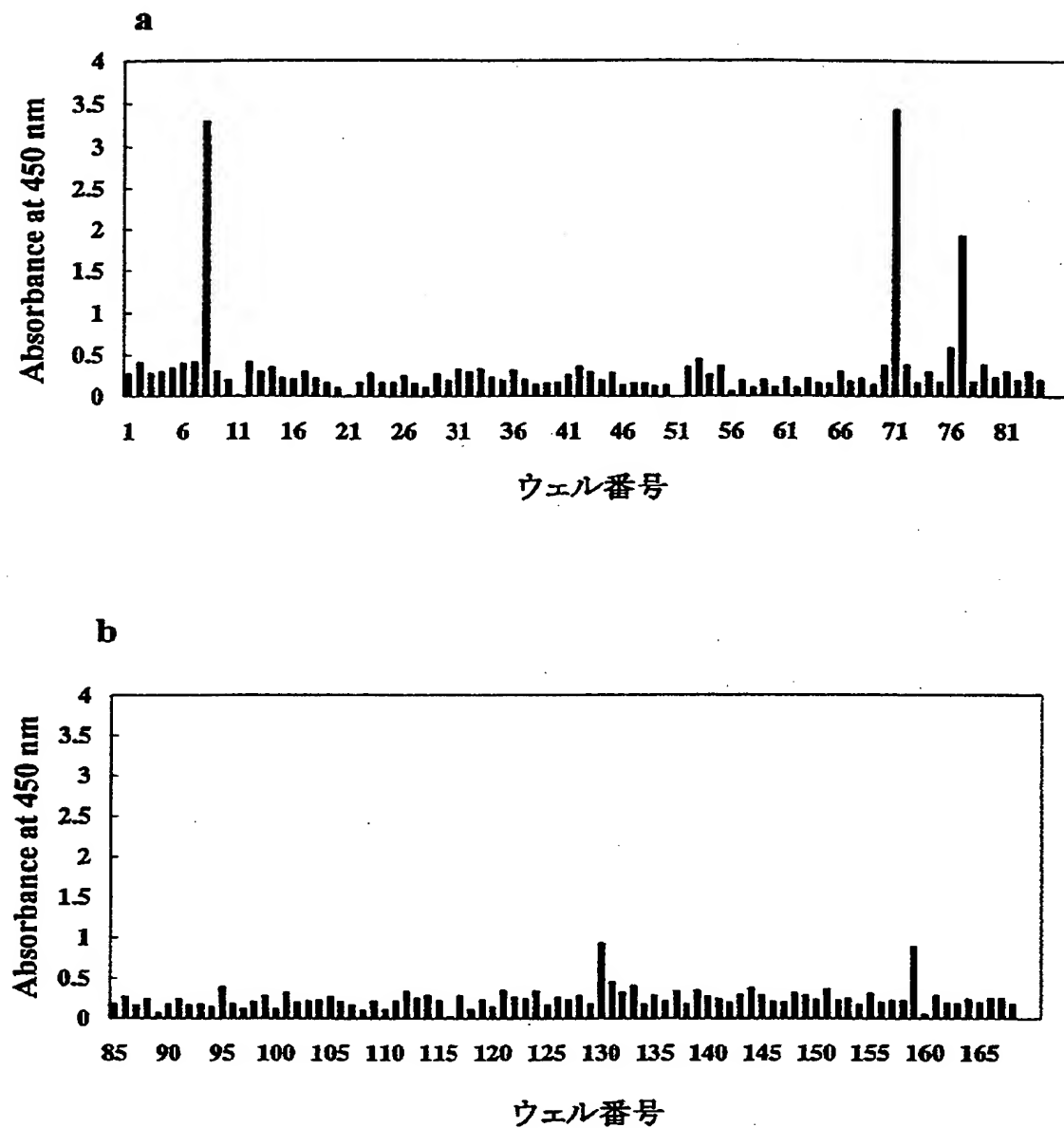
【図 2】



【図 3】

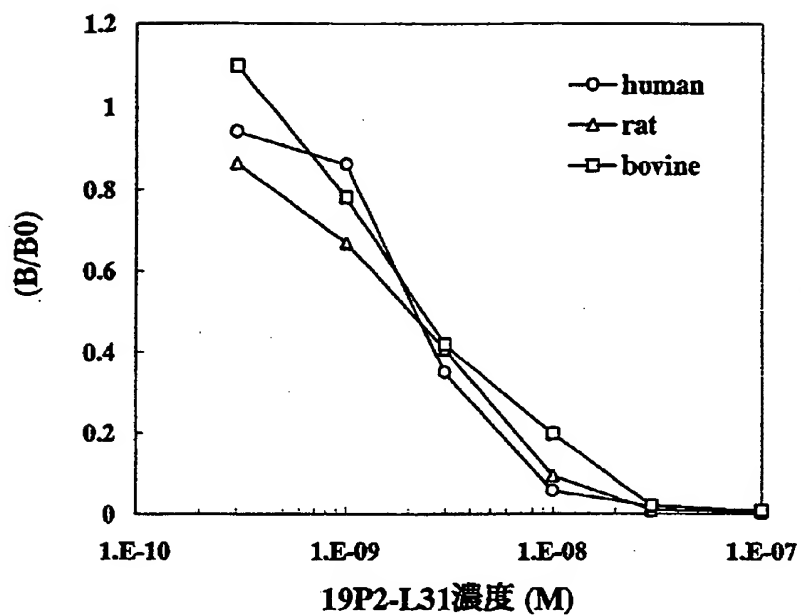


【図 4】

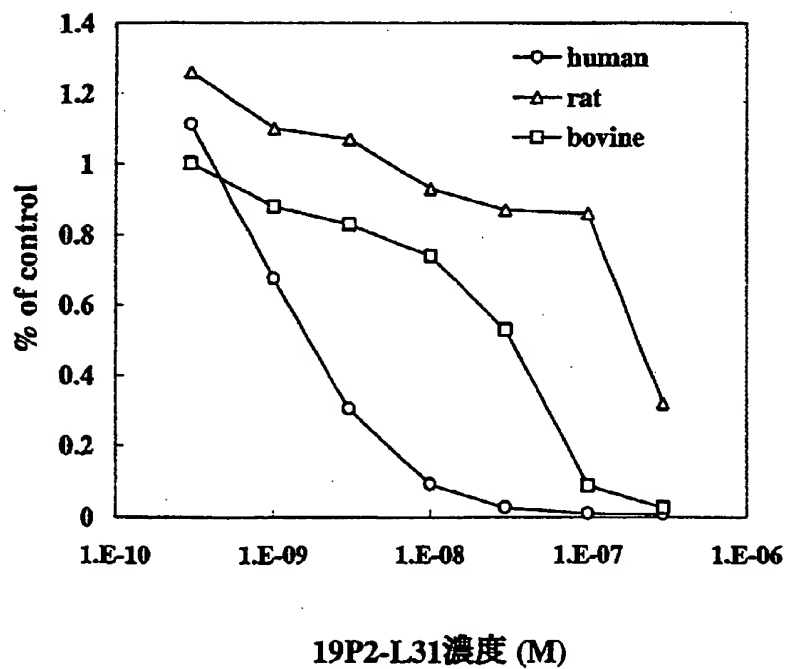


【図5】

a P2L-1Ca

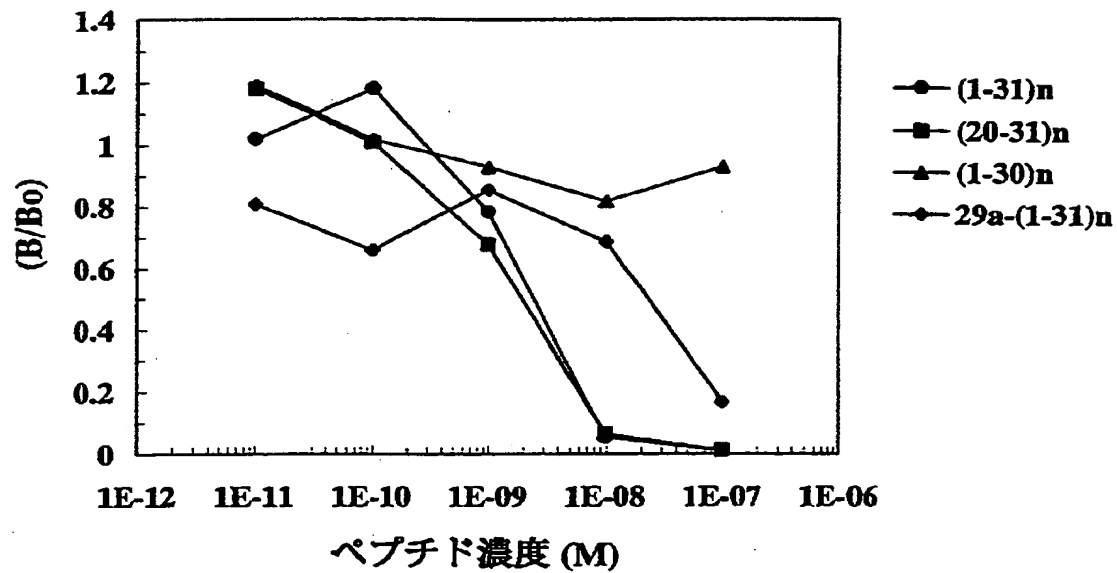


b P2L-2Ca

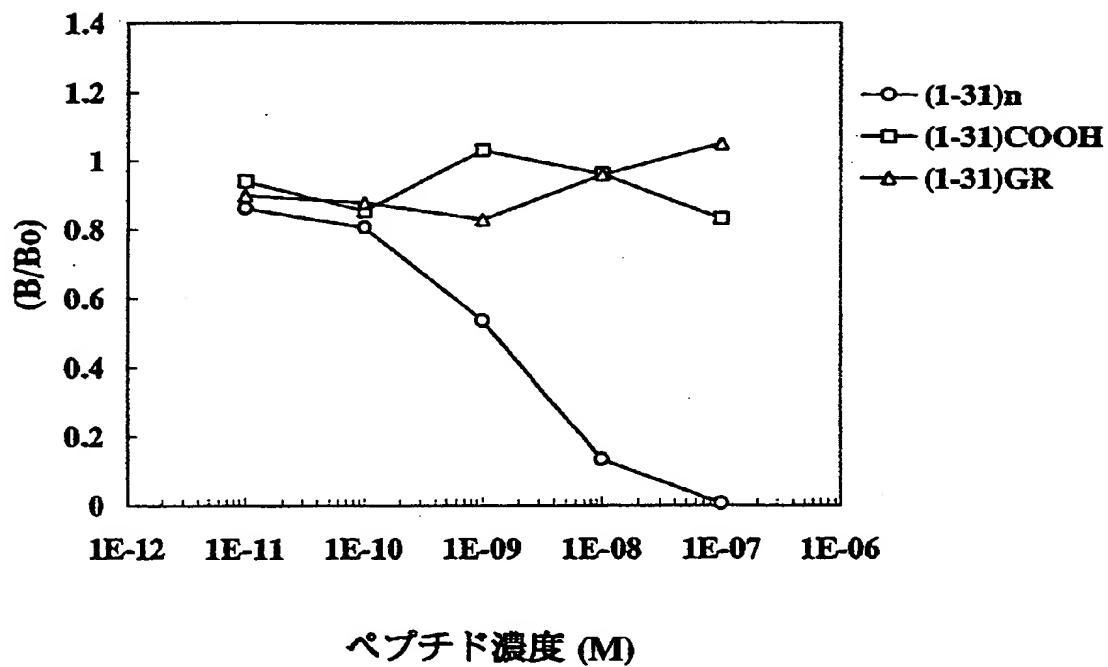


【図6】

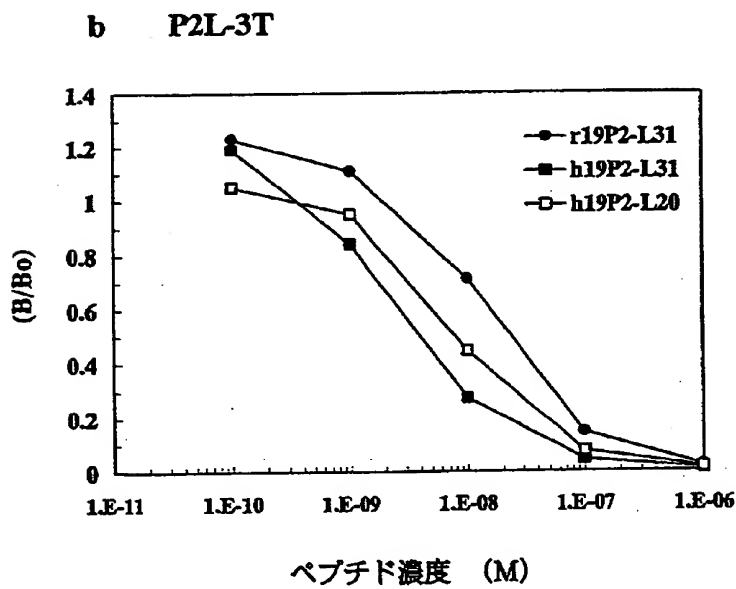
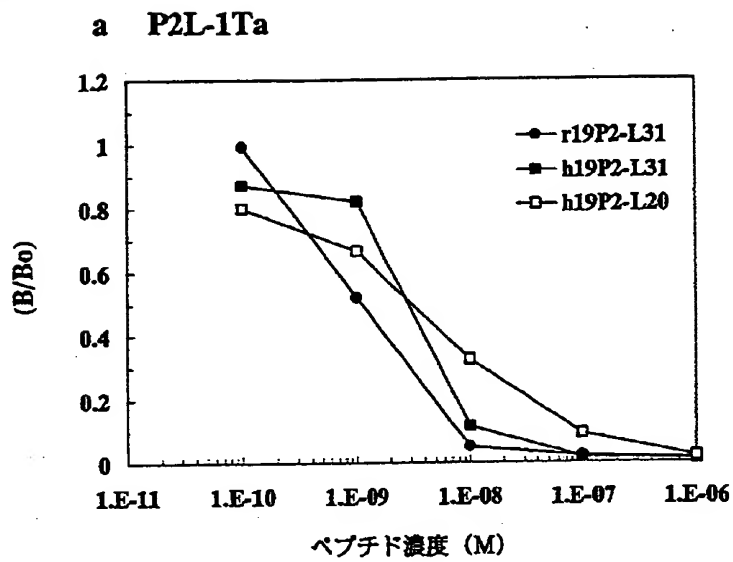
a ヒト19P2リガンド誘導体



b ウシ19P2リガンド誘導体

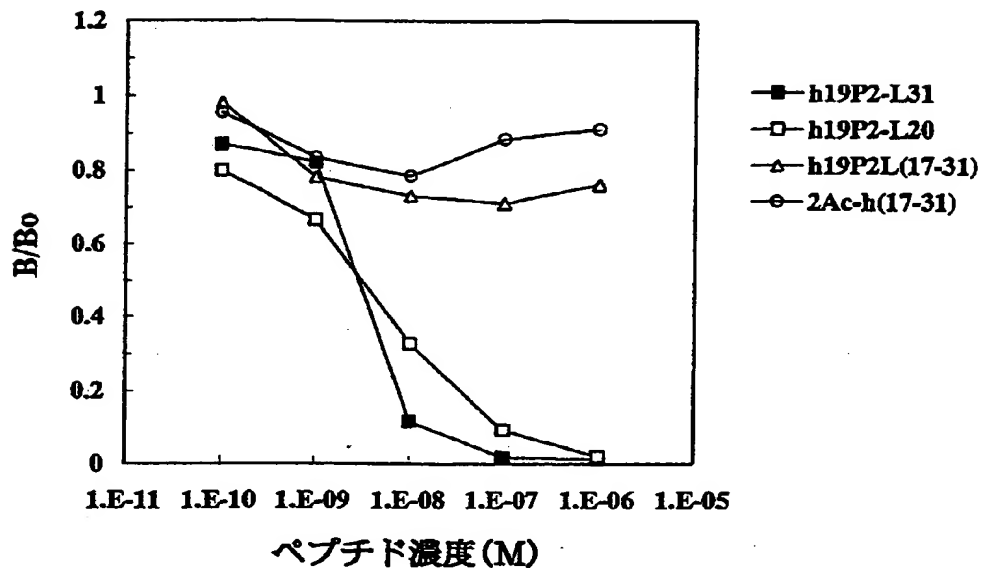


【図7】

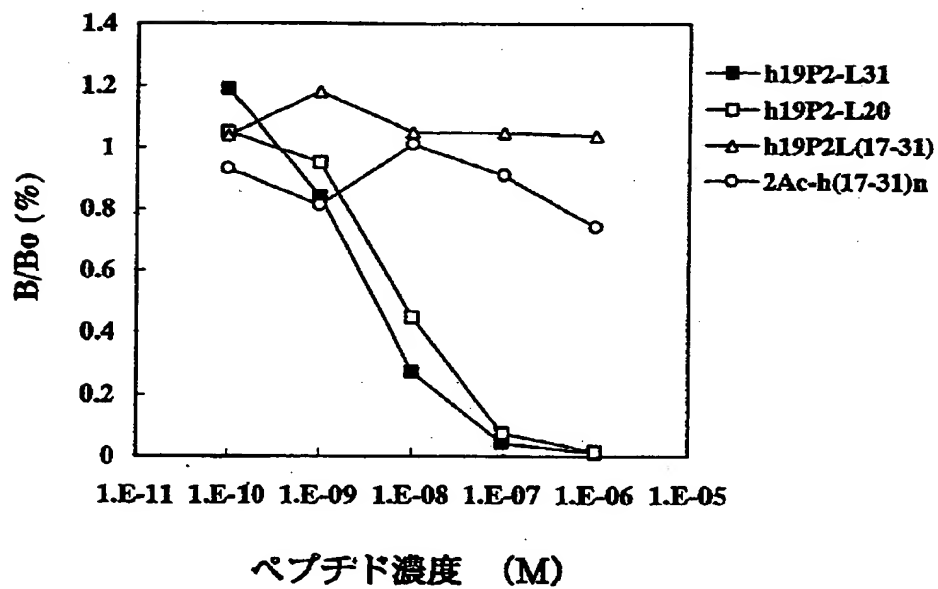


【図 8】

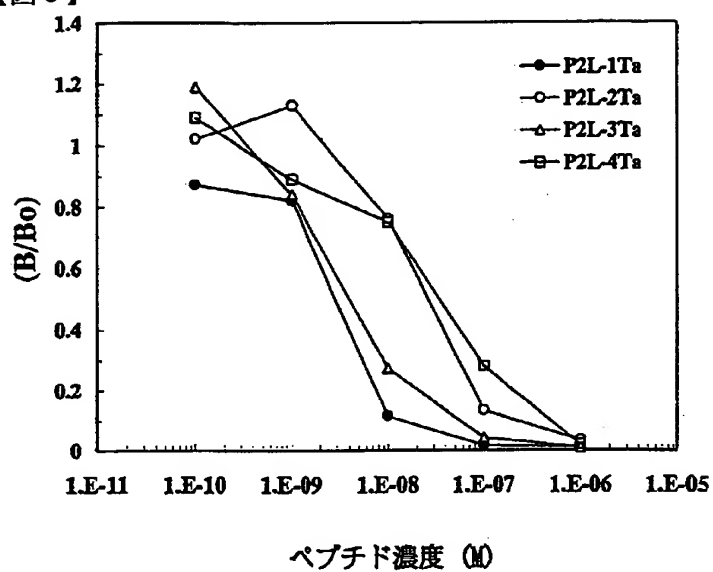
a P2L-1Ta



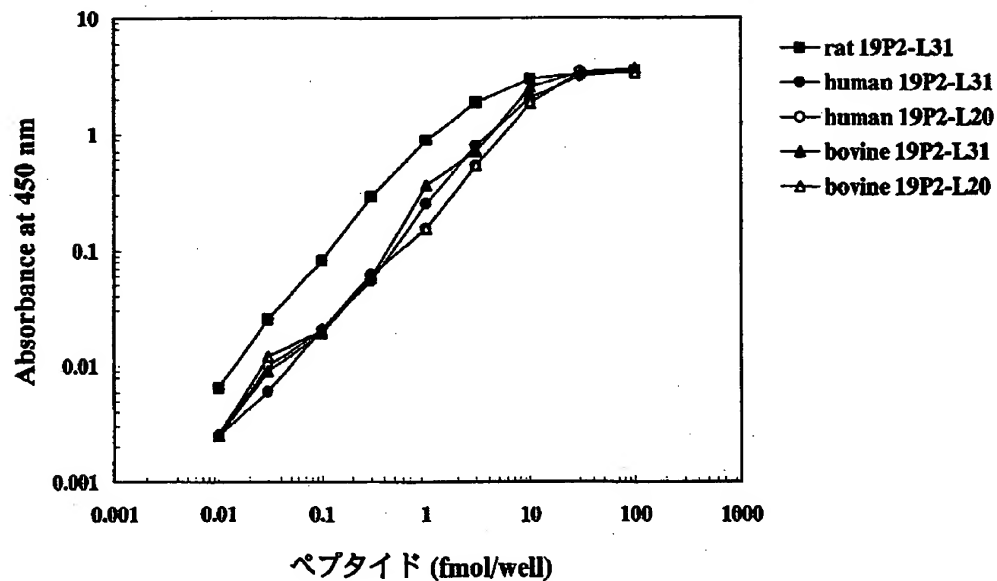
b P2L-3Ta



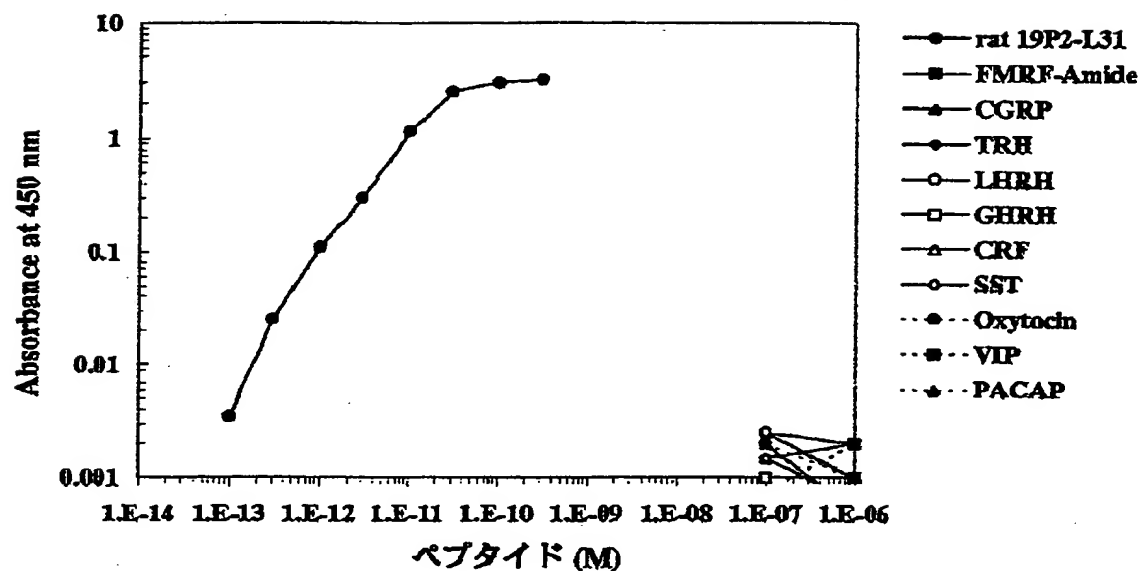
【図9】



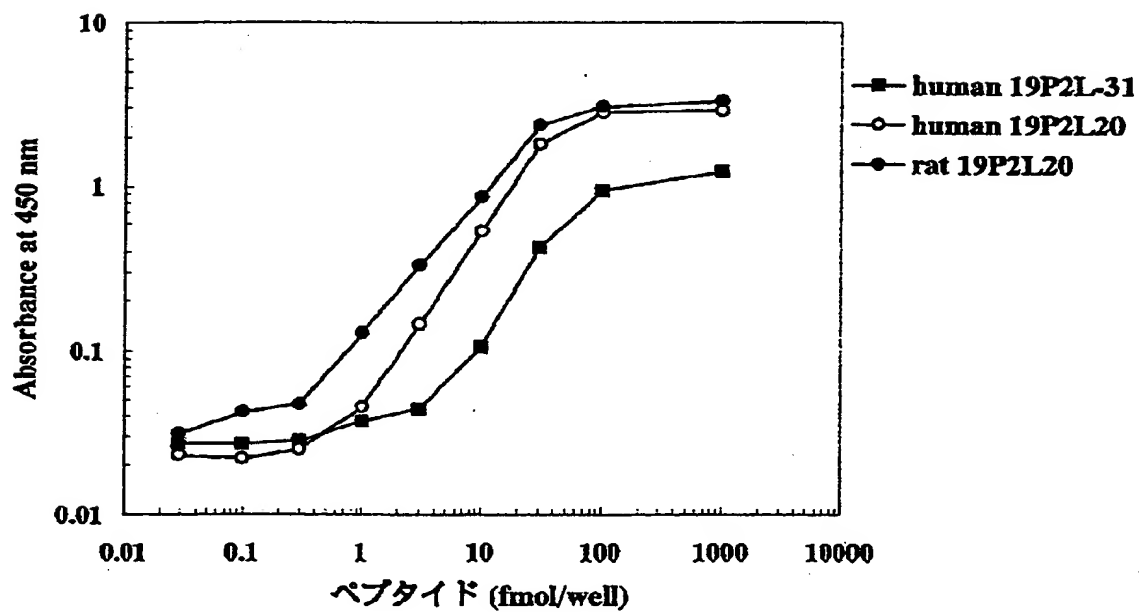
【図10】



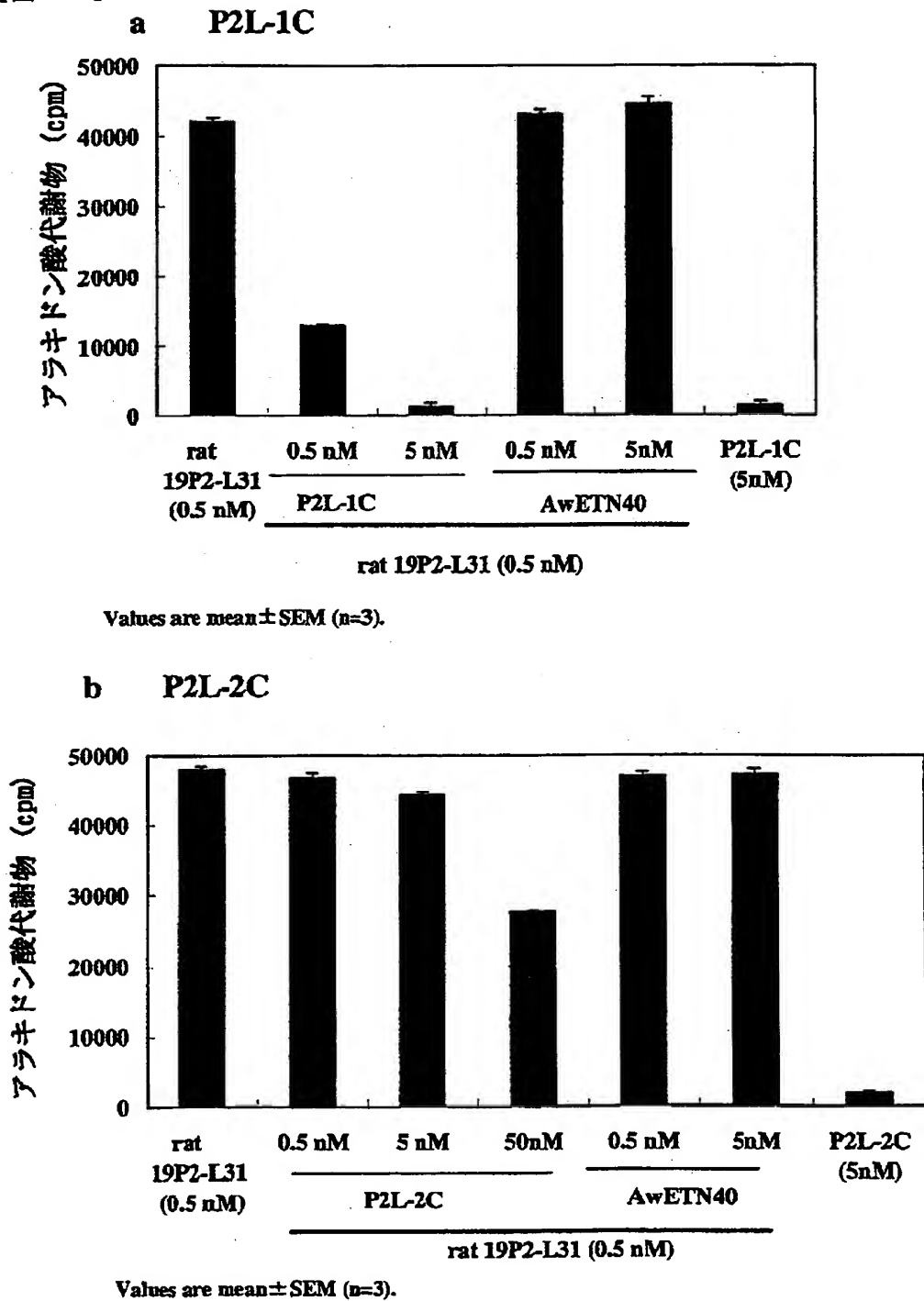
【図 1 1】



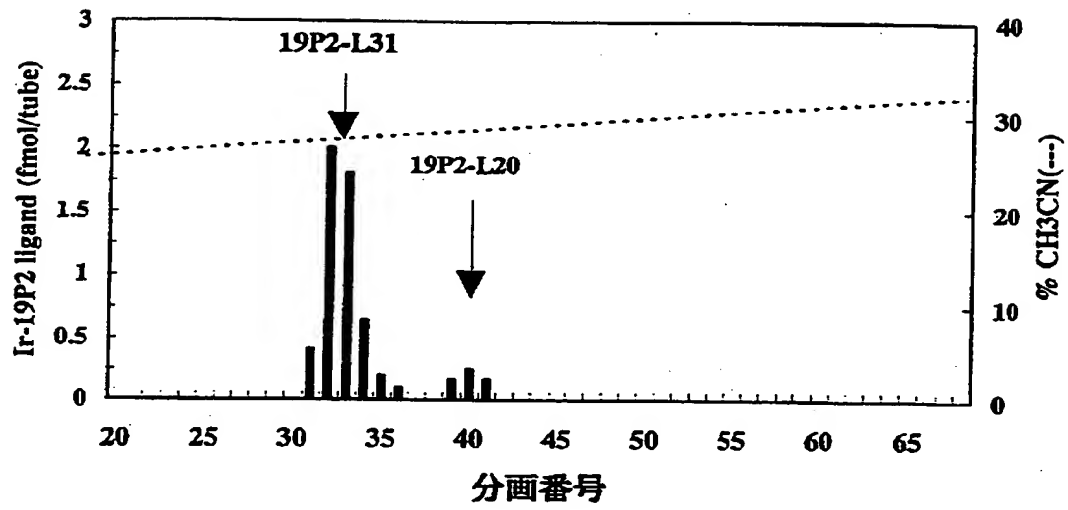
【図 1 2】



【図13】



【図 14】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】19P2リガンドまたはその誘導体に対するモノクローナル抗体の提供。

【解決手段】本発明の19P2リガンドに対するモノクローナル抗体(特に、P2L-1Ca)は、極めて高い結合能を有し、かつ19P2リガンドのアラキドン酸代謝物放出活性を中和することが出来る。従って、19P2リガンドが有すると考えられる下垂体機能調節作用(例えば、プロラクチン分泌促進作用)、中枢神経調節作用、脾臓機能調節作用などに、異常がある場合の各種疾患の診断薬、予防薬、治療薬などに用いることができる。

本発明のモノクローナル抗体を用いるサンドイッチ法(特に、該モノクローナル抗体と19P2リガンドの中間部を認識する抗体とを用いるサンドイッチ法)による免疫学的測定法により、19P2リガンドまたはその誘導体を高感度かつ特異的に定量することができる。この定量方法は19P2リガンドまたはその誘導体の生理機能の解明に用いることができる。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田
薬品工業株式会社内

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号
武田薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】 内山 務

特平10-140293

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日 1992年 1月22日
[変更理由] 住所変更
住 所 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名 武田薬品工業株式会社